



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Наталија С. Арсенијевић

**Ефекти примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.)
Maxim. на бихевиоралне манифестације
неуротоксичности изазване наночестицама калцијум
фосфата код пацова**

докторска дисертација

Крагујевац, 2021.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Natalija S. Arsenijević

**Efekti primene ekstrakta biljke *Filipendula ulmaria* (L.)
Maxim. na bihevioralne manifestacije neurotoksičnosti
izazvane nanočesticama kalcijum fosfata kod pacova**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2021.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Natalija S. Arsenijević

The Effects of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. extract in the behavioral manifestations of neurotoxicity induced by calcium phosphate nanoparticles in rats

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021.

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Наталија С. Арсенијевић
Датум и место рођења: 2.11.1984., Крагујевац
Садашње запослење: Истраживач приправник за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Ефекти примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на бихевиоралне манифестације неуротоксичности изазване наночестицама калцијум фосфата код пацова
Број страница: 121
Број слика: 55
Број библиографских података: 267
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина, Физиологија
Ментор: др сци. мед. Гвозден Росић, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 8.2.2021.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације IV-03-347/11, 12.5.2021.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. Доц. др Драгица Селаковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник; 2. Проф. др Милица Поповић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, члан; 3. Проф. др Гаврило Брајовић, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Базичне стоматолошке науке, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
Датум одбране дисертације:

Identifikaciona stranica doktorske disertacije

Autor
Ime i prezime: Natalija S. Arsenijević
Datum i mesto rođenja: 2.11.1984., Kragujevac
Sadašnje zaposlenje: Istraživač pripravnik za užu naučnu oblast Bolesti zuba i endodoncija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Doktorska disertacija
Naslov: Efekti primene ekstrakta biljke <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. na bihevioralne manifestacije neurotoksičnosti izazvane nanočesticama kalcijum fosfata kod pacova
Broj stranica: 121
Broj slika: 55
Broj bibliografskih podataka: 267
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac
Naučna oblast (UDK): Medicina, Fiziologija
Mentor: dr sci. med Gvozden Rosić, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu
Ocena i obrana
Datum prijave teme: 8.2.2021.
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske/umetničke disertacije: IV-03-347/11, 12.5.2021.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:
1. Doc. dr Dragica Selaković, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, predsednik; 2. Prof. dr Milica Popović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Bolesti zuba i endodoncija, član; 3. Prof. dr Gavriilo Brajović, vanredni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Bazične stomatološke nauke, član.
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije:
Datum odbrane disertacije:

Identifikaciona stranica doktorske disertacije

Author
Name and surname: Natalija S. Arsenijevic
Date and place of birth: 2.11.1984., Kragujevac
Current employment: Research apprentice, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: The Effects of <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. extract in the behavioral manifestations of neurotoxicity induced by calcium phosphate nanoparticles in rats
No. of pages: 121
No. of images: 55
No. of bibliographic data: 267
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine, Physiology
Mentor: Full Professor Gvozden Rosic, M.D., Ph.D. Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 8.2.2021.
Decision number and date of acceptance of the doctoral / artistic dissertation topic: IV-03-347/11, 12.5.2021.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
1. Assistant Professor Dragica Selakovic, M.D., Ph.D., Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, chairman; 2. Associate Professor Milica Popovic, D.M.D., Ph.D., Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member; 3. Associate Professor Gavrilo Brajovic, D.M.D., Ph.D., Faculty of Dental Medicine, University of Belgrade, member.
Commission for evaluation and defense of doctoral / artistic dissertation:
Date of Dissertation Defense:

САЖЕТАК:

Увод. У циљу превенције секундарног каријеса интензивно се развијају биоактивни композитни материјали који могу да отпуштају наночестице калцијум фосфата. Познато је да нано-калцијум фосфати изазивају оксидативни дисбаланс, апоптозу и поремећај функција бројних органа. Такође, потврђено је да природни продукти богати антиоксидансима умањују штетне ефекте дејства наночестица калцијум фосфата. Међу природним продуктима са потврђеним антиоксидативним дејством налази се и екстракт биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.

Материјал и методе. Истраживање је обухватитло 42 мужјака Wistar albino пацова, старости 10-12 недеља, просечне телесне масе 180-200g, подељених у седам једнаких група. Животиње су третиране нано-калцијум фосфатима (хидроксиапатит – 17.8 mg/kg, трикалцијум фосфат хидрат – 11 mg/kg и аморфни калцијум фосфат – 9.65 mg/kg) самостално, или са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. у дози од 100 mg/kg. Протоколи су трајали 30 дана. По завршеним протоколима промене у понашању су утврђене применом одговарајућих бихевиоралних тестова, док су након жртвовања, у ткиву мозга одређени маркери оксидативног статуса, апоптозе и експресије GABA A рецептора и BDNF.

Резултати. Резултати ове студије су потврдили да хронична примена наночестица калцијум фосфата изазива значајне промене у понашању, које су праћене евидентним разликама у дејству хемијски различитих форми калцијум фосфата. Такође, неуротоксичност је потврђена и променама у маркерима оксидативног стреса и апоптозе, удружених са променама у експресији GABA A рецептора и BDNF. Антиоксидативна суплементација екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. имала је неуропротективни ефекат, умањујући промене настале дејством наночестица калцијум фосфата.

Закључак. Примена екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. смањењем оксидативног оштећења може умањити или превенирати ланац догађаја, који за резултат имају испољавање бихевиоралних манифестација неуротоксичности изазване наночестицама калцијум фосфата.

Кључне речи: нано-калцијум фосфати, *Filipendula ulmaria*, бихевиорални тестови, оксидативни стрес, апоптоза, GABA A рецептори, BDNF

ABSTRACT:

Introduction: In order to prevent secondary caries, bioactive composite materials that can release calcium phosphate nanoparticles are being intensively developed. Nano-calcium phosphates are known to cause oxidative imbalance, apoptosis and dysfunction of numerous organs. Also, it has been confirmed that natural antioxidants reduce the harmful effects of calcium phosphate nanoparticles. Among the natural products with a confirmed antioxidant effect is the *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. extract.

Material and methods: The study included 42 male Wistar albino rats, aged 10-12 weeks, with an average body weight of 180-200g, divided into seven equal groups. Animals were treated with nano-calcium phosphates (hydroxyapatite - 17.8 mg / kg, tricalcium phosphate hydrate - 11 mg / kg and amorphous calcium phosphate - 9.65 mg / kg) alone, or with the *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. extract at a dose of 100 mg / kg. The protocols lasted 30 days. After completing the protocols, behavioral alterations were determined using appropriate behavioral tests, while after sacrifice, markers of oxidative status, apoptosis, and expression of GABA A receptors and BDNF were determined in brain tissue.

Results: The results of this study confirmed that chronic application of calcium phosphate nanoparticles causes significant behavioral changes, which are accompanied by evident differences in the action of chemically different forms of calcium phosphate. Neurotoxicity was also confirmed by changes in markers of oxidative stress and apoptosis, associated with changes in GABA A receptors and BDNF expression. Antioxidant supplementation with *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. extract had a neuroprotective effect, reducing the changes caused by the action of calcium phosphate nanoparticles.

Conclusion: The *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. extract, by diminishing oxidative damage, can reduce or prevent the chain of events, which result in the behavioral manifestation of neurotoxicity caused by calcium phosphate nanoparticles.

Keywords: nano-calcium phosphates, *Filipendula ulmaria*, behavioral tests, oxidative stress, apoptosis, GABA A receptors, BDNF

Захваљујем се свом ментору проф. др Гвоздену Росићу на подрици, саветима, и научном усмеравању, а посебно на разумевању и стрпљењу својственом правим учитељима.

Било је право задовољство учити од доц. др Драгице Селаковић, доц. др Немање Јовичића и др Јелене Катанић Станковић.

Посебну захвалност дугујем својим младим колегама са Катедре за стоматологију Факултета медицинских наука на уложеном труду и несебичној подрици коју су ми пружали.

Садржај

1. УВОД.....	1
1.1. Примена биоактивних композитних материјала у рестауративној стоматологији.	2
1.1.2. Калцијум фосфати као биоактивне супстанце	4
1.1.3. Улога калцијум фосфата као биоактивне компоненте композита	5
1.1.3.1. Хидроксиапатит.....	6
1.1.3.2. Аморфни калцијум фосфат	7
1.1.3.3. Трикалцијум фосфат	9
1.2. Токсичност наночестица калцијум фосфата	10
1.2.1. Токсичност наночестица	11
1.2.1.1. Оксидативни стрес изазван наночестицама.....	11
1.2.1.2. Апоптоза изазвана наночестицама	11
1.2.1.3. Инфламација изазвана наночестицама.....	11
1.2.1.3. Оштећења ДНК изазвано наночестицама	12
1.2.2. Токсичност калцијум фосфата.....	13
1.2.2.1. Оксидативни стрес изазван нано-калцијум фосфатима	14
1.2.2.2. Апоптоза изазвана нано-калцијум фосфатима	14
1.2.2.3. Инфламација изазвана нано-калцијум фосфатима	15
1.2.2.3. Оштећења ДНК изазвано нано-калцијум фосфатима.....	15
1.2.3. Неуротоксичност изазвана наночестицама калцијум фосфата	16
1.3. Примена антиоксиданаса у превенцији оштећења изазваних нано-калцијум фосфатима	17
1.3.1. Антиоксидативна заштита	17
1.3.2. Природни антиоксиданси.....	18
1.3.3. <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.....	20
1.3.3.1. Фитохемијски садржај и биолошка активност биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim	20
1.3.3.1.1. Антиоксидативна активност	21
1.3.3.1.2. Антиинфламаторна активност	21
1.3.3.1.3. Антимикробна активност.....	21
1.3.3.1.4. Антитуморска активност	22
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	23
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	25
3.1. Протоколи за третирање експерименталних животиња	26

3.1.1. Услови за чување животиња током експерименталних протокола	26
3.1.2. Припрема екстракта.....	26
3.1.3. Избор наночестица калцијум фосфата.....	26
3.1.4. Протокол и дизајн истраживања	27
3.2. Испитивање бихевиоралних ефеката примењених протокола	27
3.3. Узимање узорка можданог ткива (хипокампус и префронтални кортекс) за одређивање маркера оксидативног стреса и индикатора апоптогске активности.....	28
3.4. Квантитативна анализа BDNF и GABA-A рецептора у узорцима можданог ткива (хипокампус и префронтални кортекс)	28
3.2. Графички приказ дизајна студије.....	29
3.5. Статистичка обрада резултата.....	29
4. РЕЗУЛТАТИ.....	30
4.1. Резултати добијени бихевиоралним тестирањем	31
4.1.1. Промене параметара за процену анксиозности након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.....	31
4.1.1.1. Промене параметара <i>open field</i> теста након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.....	31
4.1.1.1.1. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене УВЦЗ током OF теста изазване наночестицама калцијум фосфата	31
4.1.1.1.2. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене БУЦЗ током OF теста изазване наночестицама калцијум фосфата	32
4.1.1.1.3. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене УПП током OF теста изазване наночестицама калцијум фосфата.....	33
4.1.1.1.4. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене процента времена кретања током OF теста изазване наночестицама калцијум фосфата	34
4.1.1.1.5. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене БУ током OF теста изазване наночестицама калцијум фосфата	35
4.1.1.1.6. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене БСУ током OF теста изазване наночестицама калцијум фосфата.....	36
4.1.1.1.7. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене УБУ током OF теста изазване наночестицама калцијум фосфата	37
4.1.1.2. Промене параметара <i>elevated plus maze</i> теста након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.....	38

4.1.1.2.1. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене УВОК током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата	38
4.1.1.2.2. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене БУОК током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата.	39
4.1.1.2.3. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене УПП током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата...	40
4.1.1.2.4. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене %ВК током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата...	41
4.1.1.2.5. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене БУ током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата	42
4.1.1.2.6. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене БСУ током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата ...	43
4.1.1.2.7. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене БЗН током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата	44
4.1.1.2.8. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене БНН током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата ...	45
4.1.1.2.9. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене броја ТЕА епизода током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата.....	46
4.1.3. Промене параметара за процену нивоа депресивности након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.	47
4.1.3.1. Промене параметара <i>tail suspension</i> теста након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.....	47
4.1.3.1.1. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене ВППИ током TS теста изазване наночестицама калцијум фосфата ...	47
4.1.3.1.2. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене БЕИ током TS теста изазване наночестицама калцијум фосфата	48
4.1.3.1.3. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене УВИ током TS теста изазване наночестицама калцијум фосфата	49
4.1.3.1.4. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене ПВИ током TS теста изазване наночестицама калцијум фосфата	50
4.1.4. Промене параметара за процену когнитивних функција након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.	51

4.1.4.1. Промене параметара <i>novel object recognition</i> теста након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.....	51
4.1.4.1.1. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене БУЗНО током NOR теста изазване наночестицама калцијум фосфата	51
4.1.4.1.2. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене УВЗНО током NOR теста изазване наночестицама калцијум фосфата	52
4.1.4.1.3. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене ГЗНО током NOR теста изазване наночестицама калцијум фосфата .	53
4.1.5. Промене параметара за процену ноцицепције након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.....	54
4.1.5.1. Промене параметара <i>tail flick</i> теста након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.....	54
4.1.5.1.1. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене РВ током <i>tail flick</i> теста изазване наночестицама калцијум фосфата .	54
4.1.5.2. Промене параметара <i>hot plate</i> теста након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.....	55
4.1.5.2.1. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене ВДР током <i>hot plate</i> теста изазване наночестицама калцијум фосфата	55
4.2. Промене маркера оксидативног стреса након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.....	56
4.2.1. Маркери оксидативног стреса у ткиву хипокампуса	56
4.2.1.1. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене индекса липидне пероксидације у ткиву хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата	56
4.2.1.2. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене активности супероксид дисмутазе у ткиву хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата	57
4.2.1.3. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене активности каталазе у ткиву хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата	58

4.2.1.4. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене концентрације укупног глутатиона у ткиву хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата	59
4.2.2. Маркери оксидативног стреса у ткиву префронталног кортекса.....	60
4.2.2.1. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене индекса липидне пероксидације у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата.....	60
4.2.2.2. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене активности супероксид дисмутазе у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата.....	61
4.2.2.3. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене активности каталазе у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата	62
4.2.2.4. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене концентрације укупног глутатиона у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата.....	63
4.3. Промене маркера апоптотске активности након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.	64
4.3.1. Маркери апоптотске активности у ткиву хипокампуса	64
4.3.1.1. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене релативне генске експресије иРНК за Вах у ткиву хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата	64
4.3.1.2. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 у ткиву хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата.....	65
4.3.1.3. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата.....	66
4.3.2. Маркери апоптотске активности у ткиву префронталног кортекса	67
4.3.2.1. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене релативне генске експресије иРНК за Вах у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата.....	67
4.3.2.2. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата.....	68
4.3.2.3. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата	69

4.4. Промена броја BDNF имунореактивних ћелија и релативне генске експресије иРНК за BDNF након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.	70
4.4.1. Број BDNF имунореактивних ћелија у ткиву хипокампуса	70
4.4.1.1. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене броја BDNF имунореактивних ћелија у CA1 региону хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата.....	70
4.4.1.2. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене броја BDNF имунореактивних ћелија у CA2/3 региону хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата.....	71
4.4.1.3. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене броја BDNF имунореактивних ћелија у DG региону хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата.....	72
4.4.1.4. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене броја BDNF имунореактивних ћелија на укупној површини пресека хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата	73
4.4.2. Релативна генска експресија иРНК за BDNF и број BDNF имунореактивних ћелија у ткиву префронталног кортекса	75
4.4.2.1. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене релативне генске експресије иРНК за BDNF у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата.....	75
4.5. Промена броја GABA A имунореактивних ћелија и релативне генске експресије иРНК за GABA A након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.	77
4.5.1. Број GABA A имунореактивних ћелија у ткиву хипокампуса.....	77
4.5.1.1. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене броја GABA-AR2S имунореактивних ћелија у CA1 региону хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата	77
4.5.1.2. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене броја GABA-AR2S имунореактивних ћелија у CA2/3 региону хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата	79
4.5.1.3. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене броја GABA-AR2S имунореактивних ћелија у DG региону хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата.....	80
4.5.1.4. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене броја GABA-AR2S имунореактивних ћелија на површини укупног пресека хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата	81
4.5.2. Релативна генска експресија иРНК за GABA-A и број GABA-A имунореактивних ћелија у ткиву префронталног кортекса.....	83

4.5.2.1. Утицај примене екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на промене релативне генске експресије иРНК за GABA-AR2S у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата.....	83
5. ДИСКУСИЈА.....	85
5.1. Бихевиоралне манифестације дејства наночестица калцијум фосфата примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.....	86
5.1.1. Промене степена анксиозности након примене нано-калцијум фосфата примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.....	86
5.1.2. Промене степена депресивности након примене нано-калцијум фосфата примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.....	88
5.1.3. Промене у когнитивним функцијама након примене нано-калцијум фосфата примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.....	89
5.1.4. Промене у ноцицепцији изазване дејством нано-калцијум фосфата примењених самостално или удружено са екстрактом биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.....	90
5.2. Прооксидантно деловање нано-калцијум фосфата и протективно дејство екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на оксидативне механизме у možданом ткиву.....	92
5.3. Проапоптотско деловање нано-калцијум фосфата и протективно дејство екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. на механизме апоптозе у možданом ткиву.....	95
5.4. Утицај нано-калцијум фосфата и заштитна улога <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. у експресији BDNF и GABA-AR.....	98
5.5. Повезаност промена у понашању, оксидативног стреса, апоптотских маркера и експресије BDNF и GABA-AR као одговора на дејство нано-калцијум фосфата.....	99
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	100
7. ЛИТЕРАТУРА.....	102
СКРАЋЕНИЦЕ.....	120

1. УВОД

1.1. Примена биоактивних композитних материјала у рестауративној стоматологији

Упркос сталном напретку у развоју стоматолошких материјала, још увек не постоји материјал који би могао идеално да надокнади изгубљена зубна ткива (1). Динамично окружење са сталним променама рН вредности, протоком пљувачке променљивог састава, механичким оптерећењима и изложеност храни чине да рестауративни материјали морају да задовоље високе захтеве за функционалност и одрживост у оралној средини (2). Да би рестаурација испунила бројна очекивања, користе се материјали који су по хемијском саставу комплексне смеше, које поред физико-хемијских и механичких морају да задовољавају и естетске критеријуме (3).

Како дентални композити захтевају минималну препарацију структура зуба и имају повољне особине, данас су и најчешће бирани материјали за надокнаду изгубљеног зубног ткива (4). Иако примена композита почиње 60-тих година прошлог века, због чега се не могу сматрати новим стоматолошким материјалима, њихов развој је и даље интензиван (5). У претходним деценијама механичке и естетске карактеристике ових хибридни материјала су усавршене до вредности које су сличне зубним ткивима, док је њихова основна структура остала непромењена (6). Управо комплексни састав композита, у основи сачињен од органске смоле, минералног пуниоца и везујућих материја, омогућава задовољавање бројних захтева за рестауративни зубни материјал, као и могућност унапређења појединачних, циљаних особина (3).

Међутим, широка клиничка примена указла је на значајне мањкавости композитних материјала. Трајност композитних испуна је ограничена и често лошија у односу на традиционално коришћене амалгамске испуне (7, 8), док се као најчешћи разлог пропадања данашњих композитних рестаурација наводи стварање секундарног каријеса са даљим губитком зубног ткива, који је праћен неопходношћу замене испуна (9).

Секундарни каријес се развија у ткивима која непосредно окружују композитни испун и повезан је са присуством микропукотине, која представља уски простор између рестаурације и зуба у коме циркулише течност, носећи бактерије и растворене хемијске супстанце (10). Као главни фактори који утичу на стварање овог простора наводе се промена запремине композита услед централно орјентисане полимеризационе контракције (8), топлотни стресови настали због промена температуре у усној дупљи (11, 12) и неадекватна маргинална адаптација испуна која се формира дејством оклузалних сила (13). Иако се секундарни каријес развија као последица несавршености композитних материјала, однос самог испуна према чврстим зубним ткивима је најчешће пасиван.

У последњим деценијама, приметан је велики напредак на пољу стоматологије као резултат не само развоја стоматолошких техника и метода терапије, већ и значајног развоја у технологији биоматеријала. Сазнања о биоматеријалима се непрестано увећавају, како због усавршавања већ познатих материјала, тако и развоја потпуно нових биоматеријала за примену у стоматологији. У рестауративној стоматологији постоји тренд ка развоју биоактивних материјала као могућем начину за повећање трајности композитних рестаурација (14, 15).

Шири концепт биоактивности материјала подразумева способност материјала да подстиче таложње апатита када је уроњен у физиолошки медијум богат фосфатима (16, 17). Тако се међу начинима да се превенира настанак секундарног каријеса налази и примена биоактивних композитних материјала који имају способност да обезбеде

услове за реминерализацију зубних ткива која их непосредно окружују (18-22). Овај концепт биоактивности рестауративних материјала није потпуно нова идеја у превенцији секундарног каријеса, пошто су већ дуго доступни материјали за надокнаду зубних ткива који ослобађају флуор (23), док се у последњој деценији развило велико интересовање за употребу биокерамике (24).

Биоминерализација подразумева процес у коме се неорганске супстанце интегришу као структурни и функционални део живих организама, често у директном и блиском контакту са матрицом у виду сложене структуре протеина или угљених хидрата. Комплексна организованост праћена сложеним функцијама минерализованих зубних ткива резултат су интеракције између органских молекула матрице и у њу интегрисаних минералних једињења (25).

Како се у основи стварања каријеса дентина, глеђи и цемента, као високо минерализованих ткива, налази дисбаланс између реминерализације и деминерализације, услови који фаворизују биоминерализацију морају бити континуирани и трајни.

Способност композита да врши реминерализацију зубних ткива потиче од супстанци које улазе у састав његове неорганске компоненте, а чијим се отпуштањем сварају високе концентрације јона калцијума и фосфата унутар микропукотине (26). Међутим као главни недостатак испитиваних биоактивних композита наводи се ограничено отпуштање калцијум фосфата на неколико месеци. Да би се ови недостаци предупредили паралелно са усавршавањем неорганске компоненте побољшавају се и особине смола које треба да обезбеде повољно окружење за поновно пуњење јонима Ca^{2+} и PO_4^{3-} (27). Могућност поновног пуњења материјала неорганским биоактивним једињењима, пореклом из пљувачке, отворили су потпуно нови приступ у развоју денталних композита.

Поред преципитације јона у деминерализована ткива, посебан аспект биоактивности у спречавању развоја секундарног каријеса, отпуштањем јона из композитних испуна, односи се на способност фосфатних јона да неутралишу киселине настале бактеријском активношћу, као додатни механизам заштите од губитака минерала из зубних ткива (28).

Биоактивни материјали који садрже пунила која ослобађају јоне у рестауративној стоматологији могу наћи клиничку примену као композити за рестаурације (4), али и у адхезивним системима, чиме се смањује хидролитичка деградација хибридног слоја (4, 29).

1.1.2. Калцијум фосфати као биоактивне супстанце

Захваљујући сличности са неорганском фракцијом минерализованих ткива, кости, глеђи, дентина и цемента, калцијум-фосфати представљају начешће проучавану групу материја са биолошком активношћу (30, 31). Кључна особина ових једињења која је омогућила широку медицинску примену је способност растварања у води и телесним течностима, са постизањем високих концентрација јона калцијума и фосфата. Калцијум-фосфати су у досадашњим истраживањима показали највећи потенцијал за реминерализацију чврстих ткива (32).

Примена синтетских калцијум-фосфатних материјала почиње 1920. године, када је кристални облик калцијум фосфата употребљен за надокнаду ткива код хируршки изазваних дефеката кости зеца (33). Велико интересовање за биокерамику на бази калцијум фосфата јавило се тек четрдесет година касније, када се на њих гледало као на биоматеријале који могу да индукују репарацију и санацију коштаних дефеката (34). Осамдесетих година прошлог века синтетички калцијум фосфати, првасходно хидроксиапатит (НА), су трајно уведени у максилофацијалну хирургију и имплантологију, а истраживања о употреби природних калцијум фосфата постала су интензивна у свим областима стоматологије (31). Тако су честице НА 1988. године први пут интегрисане у композитну смолу (35), док су прве студије о реминерализацији глеђи, употребом смола које садрже честице аморфног калцијум-фосфата (АСР) објављене 1990-их година (35, 36).

За разлику од првих генерација заменика кости који су били инертни, савремени препарати вештачке кости, када се поставе у дефекте, стимулишу диференцијацију остеобласта и продукцију нове кости. Током времена растварањем ових препарата обезбеђују се јони калцијума и фосфата за минерализацију органског матрикса, а истовремено се сам препарат замењује новоформираном природном кости (37, 38).

Савремена истраживања разматрају могућност употребе калцијум фосфата као носача биолошки активних супстанци (39, 40). Њихове наночестице се сматрају идеалним средствима која могу да се користе у сврху испоруке лекова, генске терапије и у био-визуализационим методима дијагностике. Оне активним супстанцама које носе пружу заштитно окружење, онемогућавајући њихову разградњу, уз олакшавање продора кроз ћелијску мембрану и контролу ослобађања (41). Калцијум-фосфатне наночестице су способне да инкапсулирају различите лекове у својој крутој матрици дајући превенцију готово целокупном превременом ослобађању лека у физиолошком стању плазме (pH 7.4), док се у киселом окружењу, какво је у лизосомима (pH 4.0–5.0), не растворе на јоне калцијума и фосфата (42). Међутим, наночестице калцијум фосфата имају проблеме са ограниченом капацитетом пуњења, обилним почетним али и краткотрајним ослобађањем активне супстанце (43).

1.1.3. Улога калцијум фосфата као биоактивне компоненте композита

Иако су и калцијум силикати и биоактивна стакла интензивно проучавани (44, 45), калцијум фосфати су вероватно најзаступљенија група једињења која се користе као активне супстанце које, као део композитних материјала, имају способност реминерализације зубних ткива (15)

Мали је број комерцијалних биоактивних денталних композита. Међутим, интензивно се спроводе истраживања која за циљ имају развој нових композита који укључују различите форме калцијум фосфата, природно заступљених у процесу биоминерализације, као биоактивне компоненте (46). Важно је истаћи да је већина ових студија заснована на интеграцији АСР и НА, а врло мало на монокалцијум фосфат монохидрата (МСРМ), дикалцијум фосфат дихидрата (ДСРД), трикалцијум фосфата (ТСР) и тетракалцијум фосфата (ТТСР) у денталне композите (47-51). Разлог је што одређени фактори као што су растворљивост, међусобни однос концентрација јона, начин синтезе, механичка својства и морфологија неорганске материје, кроз услове који се одржавају у усној дупљи, утичу на својства рестауративних материјала (24).

Са/Р однос значајно утиче на растворљивост калцијум-фосфатних једињења. Тако се калцијум фосфати према растворљивости налазе у следећем поретку: ТТСР > α -ТСР > ДСРД > ДСРА > ОСР > β -ТСР > НА (52). Истраживања су показала да ако је однос калцијума и фосфора у једињењу мањи од 1, тада ће растворљивост примењеног материјала бити сувише велика, док се са његовим повећањем овај значајан параметар биоактивности може смањити (53). Однос Са/Р код АСР и ДСРД је 1.0, а за МСРМ је 0.5. Веома ниска растворљивост постиже се Са/Р односом већим од 1.5, па се за композитне материјале који садрже НА, са Са/Р односом од 1.67, очекује веома ниска растворљивост, а тиме и мала способност реминерализације зубних ткива (54).

Како би се повећала способност биоминерализације, калцијум фосфати су у биоактивним денталним композитима заступљени у облику наночестица (55-57). Наночестице захваљујући својој великој релативној површини остварују велики број контаката са молекулима растварача, чиме се повећава растворљивост супстанце (58). Међутим агломерација, својствена за наночестице, може умањити механичку отпорност композита, због чега се интензивно трага за могућностима за обезбеђивање униформне дистрибуције наночестица у смоли (59-61).

Цикличне промене у рН вредности средине узрокују смењивање процеса деминерализације и реминерализације зубних ткива, али и промене фаза већег и мањег растварања калцијум фосфата пореклом из композитних испуна. Тако се у киселој средини (рН 4.0) остварују високе концентрације јона Ca^{2+} и PO_4^{3-} у непосредном окружењу зуба, док смањењем киселости средине (рН 7.0) долази до преципитације растворених јона и њиховог везивања у кристалну решетку хидроксиапатита зубних ткива (62, 63).

1.1.3.1. Хидроксиапатит

Хидроксиапатит је неорганско, калцијум-фосфатно једињење, које има типичну апатитну решеткасту структуру, са хемијском формулом $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. То је природни облик калцијум фосфата са највећим уделом у неорганској компоненти минерализованих ткива (64). НА је присутан у саставу чврстих ткива у Са/Р односу од 1.67, међутим различити јони и упражњена места чине апатитну структуру непотпуном, због чега се у истраживањима и клиничкој пракси користе синтетски производи НА са односом Са/Р већим или мањим од природног (65). Хидроксиапатит је најмање растворљив међу калцијум фосфатима, што објашњава чињеницу да је главна калцијум-фосфатна компонента у нормалним и патолошким калцификацијама (66). Такође, НА је и најстабилније калцијум-фосфатно једињење у различитим физиолошким срединама, дефинисаним температуром, рН вредношћу и саставом телесних течности (67, 68), док површина НА може да делује као центар кристализације минерализованих ткива (69).

Због великог удела у саставу чврстих ткива, као и механичких својстава која одржавају њихов интегритет, постоји велики интерес за развој терапијских метода које обнављају НА у минерализованим ткивима.

Развојем нанотехнологије, почела је и интензивна примена нано-НА у областима стоматолошких биоматеријала. Иако се НА дуго користи у клиничке сврхе, како би се искористиле његове добре механичке особине и имитирала природна структура ткива, развијају се композити који сардже различиту количину НА заједно са полимерним смолама, које композиту обезбеђују затезну чврстоћу и еластичност (70). Данас је све више студија које испитују порозности, механичке особине, биоактивност и једноставност употребе новосинтетисаних композитних материјала (71, 72). У поређењу са микрочестицама НА, нано-НА дају нека јединствена својства као што су већа растворљивост и већа површинска енергија али и боља механичка веза са матрицом изграђеном од полимера смоле (24). Штавише, забележено је да наночестице НА имају супериорну биоактивност у поређењу са већим кристалима (73). Кроз нанотехнологију омогућен је процес биомимикрије у реминерализацији зуба, односно имитирање природног начина преципитације минерала. (74, 75). Честице нано-НА, величине у распону од 20 nm до 100 nm, природно су присутне као минерална компонента чврстих зубних ткива и њиховом применом могуће је имитирати уобичајене процесе биоминерализације (76). У прилог овоме иде и потврда да апликација раствора нано-НА на деминерализовану глеђ значајно повећава микротврдоћу површине (77). Поред растварања и директне преципитације јона, нано-НА имају способност да се адсорбују на спољној површини бактеријске ћелије, смањујући њихову способност адхезије и стварања денталног плака, чиме се, на још један начин, остварују добри услови за реминерализацију ткива (78).

Показано је да величина, облик и структура НА у великој мери утиче на начин и обим реминерализације. Наночестице НА, различите морфологије, показале су већу способност реминерализације каријесних лезија у односу микрочестице, као и у односу на примену натријум-флуорида (79). Наночестице НА продиру у деминерализовану зону и делује као центар кристализације у процесу таложења минерала, што даље везује велику количину Ca^{2+} и PO_4^{3-} јона из раствора, чиме се надокнађује неорганска компонента на површини зубних ткива. На овај начин се омогућава раст кристала и чува интегритет ткива (80). Са друге стране, утврђено је да биоактивни композити који садрже 20% НА у волумену показују упоредиве вредности за механичка својства са комерцијалним композитима (81).

1.1.3.2. Аморфни калцијум фосфат

Аморфни калцијум фосфат, хемијске формуле $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \times n\text{H}_2\text{O}$; $n = 3-4.5$, је почетна фаза која се таложи из високо засићеног раствора калцијума фосфата и може се лако претворити у стабилне кристалне фазе као што је октакалцијум фосфат или апатит. Његова аморфна структура и хемијски састав узрокује стварање високих концентрација јона у воденим растворима (82). Трансформација АСР у хидроксиapatит одвија се каскадним низом реакција које почињу таложењем нестабилног аморфног прекурсора, а затим кроз више међуфаза, које често укључују другу фазу аморфног калцијум фосфата и октакалцијум фосфат, трансформише се у калцијум фосфат са структуром апатита. Након кристализације, различите форме калцијум фосфата и даље се могу наћи у кристалној решетци апатита (83).

Преципитација АСР у НА зависи од услова средине, тако у средини рН вредности мањој од 9.25 долази до трансформација АСР у октакалцијум фосфат који представља стабилнију међуфазу у стварању кости. У физиолошким условима АСР се раствара и прелази у октакалцијум фосфат, након чега долази до хидролизе и стварања термодинамички стабилног хидроксиapatита. Овај процес се одвија током неколико сати. Међутим када је рН вредност већа од 10 долази до директне трансформације АСР у НА (84, 85). У присуству других јона или макромолекула АСР може бити стабилизован а његова кристализација у апатит бити одложена. Мада тачан механизам стабилизације АСР није познат, сматра се да присуство Mg^{2+} , F^- , карбоната, пирофосфата, дифосфоната, у довољној количини, спречава трансформацију синтетског АСР у хидроксиapatит (86). У модулацији трансформације АСР у НА учествују и протеини или неоргански молекули који имају улогу центара око којих почиње кристализација у НА (20). Управо због тога је у физиолошким условима конверзија АСР, као прекурсора НА, посебно изражена у контакту са делимично деминерализованим чврстим ткивима, чији се преостали органски и неоргански молекули понашају као промотери даље кристализације (87, 88). Такође, увиђено је да у природним условима концентрација кристала расте током времена сазревања кости (89). Ова јединствена улога АСР током стварања минерализованих ткива чини га потенцијалним средством за реминерализацију у стоматолошкој примени.

Укључивање наночестица аморфног калцијум фосфата у састав денталних композита дало је обећавајуће резултате. Нови композити са нано-АСР показали су двоструко до троструко већу механичку отпорност од традиционалних композита, чиме су превазиђени недостаци примене микро-АСР, праћени смањеном меничком отпорношћу, већом порозношћу и већом апсорпцијом воде денталних композита (90). Како би се предупредиле лоше механичке особине развијене су стратегије за решавање проблема агломерације честица и побољшање односа матрица-АСР, односно полимер-пунило, које укључују усавршавање смоле у саставу композита (91). Такође постоје покушаји да се слабије механичке особине АСР-композита унапреде хибридизацијом са керамиком (силицијум диоксид, цирконијум) (92) и различитим металима (баријум, стронцијум, сребро) (28, 93)

Нано-АСР има релативно високу специфичну површину од $17.76 \text{ m}^2/\text{g}$ у поређењу са $0.5 \text{ m}^2/\text{g}$ коју имају калцијум фосфати микрометарске величине који се налазе у комерцијалним композитима. Све је већи број доказа који указују да АСР у облику наночестица, као део стоматолошких материјала, може побољшати способност реминерализације чврстих ткива због већег односа површине и запремине неорганских честица (58, 82, 94). Потврђено је да ова врста нано-пуниоца композита ослобађа висок ниво Ca^{2+} и PO_4^{3-} јона остварујући висок ниво реминерализације ткива (95). Потврђено је да нано-АСР има већи потенцијал растварања и минерализације чврстих ткива од

TSP и HA *in vivo* (96). Такође, постоје докази да се ослобађање јона знатно повећава при ниској рН, што је у основи „паметно“ понашање, јер обезбеђује услове за реминерализацију када су потребни за борбу против каријеса, а који је праћен и неутралисањем киселе средине променом рН вредности са 4 на 6.5 (20).

Разматрањем особина иновативних денталних композита који садрже нано-АСР, утврђиван је и обим отпуштања јона калцијума и фосфата. Тако се, без узимања у обзир разлике у димензијама узорка композита и њихове запремине, типичне кумулативне вредности за ослобађање Ca^{2+} , у лабораторијским условима, крећу у распону од 0.5 mmol/l (рН 7.0) до 12 mmol/l (рН 4.0). Концентрације PO_4^{3-} јона су ниже и крећу се од 0.1 mmol/l (рН 7.0) до 6 mmol/l (рН 4.0) (97). Ниже ослобађање PO_4^{3-} јона објашњено је структуром фосфатних тетраедара, као и успостављањем водоничних веза између атома кисеоника у адсорбованим молекулама воде (27). Управо на моделу композита који садржи нано-АСР развијена је прва генерација биоактивних композита који се могу пунити, као и континуирано, дуготрајно ослобађати Ca^{2+} и PO_4^{3-} јоне неопходне за реминерализацију зуба и инхибицију каријеса (20, 98).

1.1.3.3. Трикалцијум фосфат

Трикалцијум фосфат, хемијске формуле $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, представља један од најпроученијих калцијум фосфата. ТСП је неорганско једињење кристалне структуре са односом Ca/P 1.5, који се појављује у облику α - и β -фазе (99). α -ТСП је растворљивији од β -ТСП и брже се трансформише у хидроксиапатит, па добија све већу пажњу као ресурс за биоразградиву керамику и композите у рестауративној стоматологији. Како β -ТСП има стабилнију структуру и мању стопу биоразградње од α -ТСП, чешће се употребљава за регенерацију коштаног ткива (100).

Упркос многим истраживањима у овом пољу, дентални композити који садрже ТСП још увек нису комерцијално доступни. Испитивањима својстава денталних композита забележено је да се растварањем ТСП, као неорганске компоненте, повећава апсорпција воде, што даље узрокује слабљење механичке отпорности испуна (24). Како су калцијум фосфати као компонентата стоматолошких материјала, у облику наночестица показали већи потенцијал реминерализације глеђи и способност да се одупру растварању зубних ткива у киселој средини (101), тако је и примена наночестице β -ТСП, просечног пречника око 100nm, узроковала значајно побољшање минерализације глеђи и веће продирање у интеркристалне просторе (59).

Захваљујући хомогеној дистрибуцији пунила у полимерној матрици, високом степену конверзије, и способности ослобађања јона калцијума и фосфата, експериментални композитни материјали, који садрже нано-ТСП, су погодни за потенцијалну примену у рестауративној стоматологији. Такође показано је да интеграција наночестица ТСП може биоактивним композитима обезбедити механичке особине боље или исте као код комерцијално доступних композита који садрже силикате као пуниоце (102).

Како НА има малу способност реминерализације, у стоматолошким материјалима разматрана је употреба двофазних система калцијум фосфата (НА/ТСП) који могу пружити оптимални ниво растварања и повољније механичке особине (24). Управо снажнији реминерализујући ефекат нано-ТСП у поређењу са нано-НА могао би се објаснити његовом већом растворљивошћу, праћеном повећаном способношћу таложења на оштећеној глеђи (103). Двофазни облик калцијум фосфата први пут је припремљен 1986. године као смеша НА и β -ТСП (104). Касније је развијена биоразградива, порозна, нанокомпозитна структура која садржи β -ТСП и НА од које се очекује да може пружити побољшана механичка својства материјалима за надокнаду минерализованих ткива (105). Иако се двофазни калцијум фосфатни системи проучавају и користе као коштани графтови (106), све су чешћа разматрања њихове примене у рестауративним биоактивним стоматолошким материјалима (70).

1.2. Токсичност наночестица калцијум фосфата

Све веће интересовање за примену материјала за надокнаду минерализованих ткива у широком пољу медицинских дисциплина, посебно у стоматологији, прати потреба за проценом штетних ефеката, укључујући и неуротоксичност, оваквог терапијског приступа.

Достигнућима нанотехнологије, науке о наночестицама, омогућен је развој нове генерације стоматолошких материјала. Наночестице су дефинисане као нарочито дисперговане, чврсте, супрамолекуларне структуре величине од 10 до неколико стотина нанометара (107). Како дејство наночестица изазива низ биолошких одговора организама, чини се да су ови одговори последица сложене интеракције бројних фактора, а не само сопствених карактеристика наночестица. При контакту са биолошком средином, наночестице одмах бивају окружене молекулима средине, што доводи до стварања специфичног протеинског омотача, који се назива согопа, и формирања динамичног комплекса наночестица-омотач (108, 109). Као главна карактеристика наночестица наводи се релативна површина, чији већи однос површине и запремине, подразумева да ће се више бимолекула везати за површину наночестице (110). Такође, већи однос површине према запремини честица диктира и њихову већу растворљивост у биолошким флуидима (111).

Искорак који је нанотехнологија направила у производњи лекова и медицинских средстава доводи до све већег коришћења различитих наночестица у медицинским процедурама, међутим због све чешће потврде токсичности и дугорочних секундарних нежељених ефеката њихова примена постаје ограничена (112). Тако се нанотоксикологија, која проучава штетна дејства наноматеријала ради бољег разумевања и процене здравствених ризика који су повезани са њиховом употребом, све чешће бави и честицама примењеним у медицинске сврхе (113).

1.2.1. Токсичност наночестица

Увођење честица нановеличине у различите медицинске процедуре удружено је са појавом бројних патофизиолошких догађаја, укључујући оксидативи стерс, оштећења ДНК и апоптозу.

1.2.1.1. Оксидативни стрес изазван наночестицама

Већина досадашњих студија сугерише да генерација ROS са стварањем оксидативног дисбаланса не само да се често примећују код токсичности изазване дејством наночестица, већ представљају и фундаментални догађај у оштећењу ћелија (114). Главним предусловима за развој оксидативног стреса изазваног наночестицама сматрају се како оксидативна својства самих наночестица, тако и стварање слободних радикала у интеракцији наночестице и ћелије (113). Физичко-хемијске карактеристике наночестица, укључујући величину, површински набој и хемијски састав, кључни су фактори у развоју оксидативног одговора који води коначном оштећењу ћелија (115). Такође је показано да оксидативни стрес настао под утицајем наночестица даље индукује низ патофизиолошких исхода попут генотоксичности, инфламације, канцерогенезе и апоптозе (116).

Иако је указано да је механизам за развоја оксидативног стреса различит за сваку врсту наночестица, тачан основни ћелијски механизам индуковања оксидативног дисбаланса до сада није потпуно разјашњен. Већина наночестице на бази метала изазива токсичност посредовану слободним радикалима (117). До сада је показано да се наночестице попут Ag, TiO₂, ZnO и CuO нагомилавају на површини мембрана или унутар субћелијских органела и индукују каскадну активацију фактора који на крају резултирају оксидативним стресом (118-127), док са друге стране, постоје и потврде о директној токсичности наночестице насталој без промена у продукцији ROS (128). Ипак, чини се да стварање ROS и оксидативни дисбаланс представља суштински догађај у оштећењу ћелија изазваних честицама нано-величине (116).

1.2.1.2. Апоптоза изазвана наночестицама

Као главни механизам ћелијске смрти узроковане наночестицама наводи се апоптоза посредована оксидативним стресом. Међу различитим начинима сигнализације који воде оштећењу ћелија наночестицама металних оксида, митохондријски апоптотски пут игра главну улогу (124, 126, 129-131). Висок ниво ROS у митохондријама може довести до оштећења мембранских фосфолипида који индукују деполаризацију митохондријске мембране (132). Вреди напоменути да је афинитет различитих врста наночестица за исту ћелију различит, а такође је различит и степен токсичности који ове честице производе (116).

1.2.1.3. Инфламација изазвана наночестицама

Величина и површински набој наночестица диктирају и врсту цитокина који се ослобађају њиховим дејством на ћелије (133). Поред директног ефекта наночестица на продукцију медијатора запаљења, показано је да оксидативни стрес такође резултира ослобађањем проинфламаторних фактора кроз главне каскадне путеве, као што су NF-κB, MAPK и PI3Ks (134-136), што сугерише да је настали оксидативни стрес индиректно повезан са запаљењем.

И *in vitro* и *in vivo* студије су показале да наночестице могу довести до оштећења плућа путем ROS-посредоване активације NF-κB и продукције TNFα, IL8, IL2 и IL6 медијатора запаљења (137, 138). Тако је показано да наночестице металних оксида, укључујући ZnO, Fe₃O₄, показују своју токсичност стварањем цитокина индукованих NF-κB сигналним путем (139, 140).

1.2.1.3. Оштећења ДНК изазвано наночестицама

Подаци доступни у литератури указују да деловањем наночестица може да настане широк спектар оштећења ДНК, као што су хромозомске фрагментације, прекиди ланаца ДНК и индукција генских мутација (141). Утврђено је да наночестице метала и металних оксида, Ag, TiO₂, ZnO, Fe₃O₄, CuO₃, CeO, индукују апоптозу праћену директним оштећењем ДНК (127,142-148), док је описано да наночестице могу изазвати оштећење ДНК и уз посредовање промена у оксидативном статусу, са апоптозом као могућим исходом (149-152). Као одговор на оксидативно оштећење ДНК, ћелије заустављају ћелијски циклус и покрећу механизме поправљања ДНК, или покрећу апоптозу. Један од главних ефекторних молекула активираних оштећењем ДНК је p53. p53 игра централну улогу у поправљању ДНК и заустављању ћелијског циклуса, спречавајући тако мутагене догађаје који фаворизују процес карциногенезе (113).

1.2.2. Токсичност калцијум фосфата

Калцијум фосфатна једињења се широко примењују у превентивним, рестауративним и регенеративним третманима у различитим областима медицине. Калцијум фосфати у медицинску употребу улазе у облику микрочестица, међутим развој технологије у терапијску примену уводи наночестице калцијум фосфата као форму која има већи биолошки потенцијал (41).

Иако су се дуго сматрали биокомпатибилним материјалима, испитивања токсичности калцијум фосфата нано-величине дало је опречне резултате. Литературни подаци показују да се под дејством нано-калцијум фосфата развија низ морфолошких, функционалних и биохемијских промена различитих система органа. Тако је, кроз истраживање на пацовима, утврђено да орална примена нано-НА индукује нефротоксичност са променама у биохемијским параметрима, производњом цитокина и променом у нивоу р53 бубрега (96), док његова интраперитонеална примена у нижим дозама може да узрокује апоптозу без некрозе ћелија јетре и бубрега (153). Такође указано је да системска примена нано-НА изазива промене у функцији јетре са повећањем AST, ALT и ALP код зечева (154), а да су наночестице β -ТСР имплантиране у коштане дефекте код зеца изазвале прекомерни и продужени инфламаторни одговор удружен са смањеном регенерацијом кости (155).

Када се сагледају резултати студија које су се бавиле механизмом токсичности увиђа се да су спроведена опсежна истраживања о интеракцији нано-НА са различитим врстама ћелијама, док су слична испитивања других калцијум-фосфатних једињења малобројна. Са друге стране, подаци из лутературе указују да степен деградације, који између осталог зависи и од хемиске структуре калцијум фосфата, директно утиче на вероватноћу појаве апоптозе у ћелији (111). Сходно томе, способност растварања нано-калцијум фосфата у воденим растворима има важну улогу у њиховим ефектима након уношења у организам. Такође, захваљујући особинама биолошких течности, растворљивост наночестица у њима је углавном већа него у води (156) што може бити последица самог хемијског састава наночестице са једне и биолошке течности са друге стране, али и особености површине наночестице која реагује (157). Ова чињеница се може довести у везу са формирањем слоја адсорбованих биомолекула, пореклом из биолошке течности у коме се наночестица налази. Иако се растварање наночестица у телесним течностима неминовно одвија, оно представља динамичан процес у коме активно учествују биомолекули, посебно протеини, који чине овај биолошки активан омотач наночестице (158). Како је растварање наночестица сложен процес, бројне особине честица калцијум фосфата које директно утичу на степен растворљивости утичу и на степен оштећења третираних ћелија. Потврда ове тврдње налази се у студијама које понаособ анализирају појединачне физичко-хемијске особине калцијум фосфата и њихов утицај на апоптозу. Међу њима је значајно поменути истраживање у коме је на ћелијама леукемије показано да је нано-АСР, калцијум фосфат са ниском вредношћу кристализације, изазвао изузетан степен индукције апоптозе у поређењу са осталим нано-калцијум фосфатима (159). Такође, обимнија појава апоптозе потврђена је при примени нано-НА нижег у односу на виши степен кристализације (160). Утврђено је и да однос Са/Р калцијум фосфата значајно одређује степен вијабилности третираних ћелија (131), док ниво апоптозе зависи и од морфологије и величине честица (130).

Значајно је поменути да описана повезаност између растворљивости агенса и степена и начина оштећења ћелија може да укаже да нано-калцијум фосфати не утичу само директно на токсичност, већ и индиректно дејством јона добијених њиховим растварањем (156).

Наночестице калцијум фосфата захваљујући ниској растворљивости у неутралној средини бивају ендоцитозом транспортовани у лизозоме ћелија, у којима се у условима ниске рН вредности растварају, што резултира ослобађањем различитих биолошки активних врста јона (129, 160). Растварањем различитих форми калцијум фосфата добијају се и сразмерне вредности концентрација јона OH^- , Ca^{2+} , PO_4^{3-} који на различите начине уграђавају функције ћелија. Тако интрацелуларно повећање концентрације OH^- може директно реметити оксидативну равнотежу (161, 162), док пораст концентрације Ca^{2+} , као значајног медијатора метаболизма ћелија, пореклом из екстрацелуларне средине, могло би изазвати низ промена у ћелији укључујући и оксидативни стрес и апоптозу (163). Такође, постоје докази који показују да PO_4^{3-} јони, као један од производа разградње калцијум фосфата, има потенцијал да индукује апоптозу модулацијом потенцијала митохондријске мембране (ММП). Познато је и да је овај ефекат знатно појачан повећаним концентрацијама интрацелуларног калцијума (164).

1.2.2.1. Оксидативни стрес изазван нано-калцијум фосфатима

Како механизми дејстава, укључујући и механизам токсичности, нано-калцијум фосфата нису у потпуности расветљени, индукција апоптозе би могла бити последица оксидативног дисбаланса, што потврђују и резултати истраживања у којима су показане истовремене промене у факторима апоптозе удружене са оштећењима оксидативне равнотеже у ћелијама. Подаци из литературе показују да деловање нано-НА узрокује промене у редокс-статусу ћелија са повећањем продукције ROS и смањењем антиоксидативне заштите. Са овим променама примећено је и повећање експресије индикатора апоптозе, чиме је показано да нано-НА узроковањем оксидативног стреса доводи до активације митохондријалног пута апоптозе, праћеног активацијом проапоптотског Вах и смањењем антиапоптотског Bcl-2 фактора, који даље активира каскадну реакцију каспаза потврђену појачаном експресијом каспазе 3 (129, 130, 165).

1.2.2.2. Апоптоза изазвана нано-калцијум фосфатима

Анализа молекуларних механизма указује да би се оштећење ћелија, као последица дејства нано-калцијум фосфата, могло развити различитим путевима апоптозе. Иако бројни подаци указују да је унутрашњи пут апоптозе кључни механизам токсичности, још увек није постигнут консензус о томе да ли се апоптоза развија каспаза зависним или каспаза независним путем.

У *in vitro* истраживању на ћелијској линији остеобласта показано је да наночестице НА улазе у ћелију ендоцитозом и бивају транспортоване у лизозомима. Затим појачано стварање ROS и смањењем антиоксидативне заштите довели су до оксидативног дисбаланса који не само да је покренуо лизозом-зависни пут оштећења ћелије повећањем пермеабилности мембране лизозома и ослобађањем катепсина В у цитоплазму, већ и пут оштећења зависан од митохондрија, регулисан експресијом Вах и Bcl-2 маркера апоптозе са последичним смањењем потенцијала митохондријске мембране и активација каспазе 3. Додатно, повећана концентрација ROS је такође изазвала и оштећење ДНК (129). На истој линији остеобласта показано је и да нано-НА изазива апоптозу уз појачану генерацију ROS и појачану експресију p53 који даље активира Bcl-2 фамилију регулаторних протеина, а који заједно са налазом повећања цитосолне и смањењем митохондријалне фракције цитохрома С указују на митохондријски пут активације апоптозе (130). Међутим, применом нано-НА,

различитог степена кристалizације, утврђено је да је степен апоптозе директно срезмеран концентрацији интрацелуларог калцијума, што упућује да би јони калцијума добијени растварањем калцијум фосфата могли бити главни промотери оштећења ћелија (163). Повећање концентрације Ca^{2+} у хуманим ћелијама карцинома дојке, претходно третираних нано-НА, резултирало је активацијом каспаза независног пута удруженог са исцрпљивањем депоа аденозин трифосфата (АТР) као познатог промотера апоптозе. Такође, претпостављено је да је пораст концентрације калцијума у ћелијама изазвало и оштећење њиховог цитоскелета (166).

In vivo је такође потврђено да нано-НА изазива пораст проапоптотског маркера Вах у ћелијама бубрега (167), док је примена β -ТСР изазвала повећање интрацелуларне концентрације Ca^{2+} и PO_4^{3-} , повећање продукције ROS са повећањем експресије Вах, каспазе 3, каспазе 8 и каспазе 9. β -ТСР је изазвао и заустављање ћелијског циклуса у G0/G1 фази (165).

1.2.2.3. Инфламација изазвана нано-калцијум фосфатима

Треба напоменути да постоје потврде да оштећења ћелија нано-калцијум фосфатима могу бити повезана са повећаном експресијом медијатора запаљења. Тако је нано-НА, поред биохемијских промена, узроковао и пораст p53 праћен порастом TNF α и IL6 у бубрезима пацова (96), док је у другом истраживању на пацовима доказано повећање TNF α заједно са повећањем активности Вах маркером апоптозе (167). Исти резултат деобијен је и у *in vitro* условима, на ћелијској линији макрофага (160).

1.2.2.3. Оштећења ДНК изазвано нано-калцијум фосфатима

Уз промене у факторима апоптозе потврђено је да дејство нано-НА може да изазове и оштећења ДНК остебласта (129), а нано- β ТСР оштећење ДНК ћелија хепатоцелуларног карцинома (165).

1.2.3. Неуротоксичност изазвана наночестицама калцијум фосфата

Поред познате дистрибуције након системске примене (169), као и потврђене токсичности праћене променама функција и морфологије, као и молекуларних механизма ћелија бројних органа, показано је да наночестице калцијум фосфата пролазе кроз крвно-мождану баријеру и улазе у различите регионе мозга (170). Међутим, у литератури не постоје подаци о њиховом деловању на централни нервни систем, укључујући и неуротоксичност. Штавише, оскудне су и информације о дејству нано-калцијум фосфата на ћелије нервног система. Према резултатима *in vitro* истраживања, до сада је познато да нано-НА узрокује оксидативни стрес праћен повећаним степеном апоптозе у култури глија ћелија (171).

Иако су молекуларни механизми у основи неуротоксичности наночестица још увек прикривени, резултати ранијих истраживања указују на бројне путеве уношења наночестица различитог хемијског састава у централни нервни систем. Њихово деловање је праћено неуротоксичношћу са испољавањем карактеристичних промена у понашању (156). Заправо, наночестице Ag и TiO₂ стимулишу глија ћелије да ослобађају проинфламаторне цитокине и генеришу ROS са појачаном производњом NO (172, 173), док примена нано-Ag смањује и активност антиоксидативних ензима у неуронима (174). Токсичност наночестица ZnO такође је повезана са њиховом способношћу да производе ROS (175), док су нежељеним ефектима у мозданом ткиву приписани и повећана продукција инфламаторних цитокина, фрагментација ДНК и стимулација апоптозе, показана код пацова (176). Слично претходном и наночестице CuO изазвале су оштећење хипокампаљних неурона и повећали ниво производње ROS са смањењем антиоксидативне заштите (126), док је оксидативни стрес праћен повећањем нивоа каспазе 3 у мозгу представљен као главни узрок оштећења ћелија под дејством нано-Au (177). Морфолошки различити облици наночестица Al₂O₃ индуковали су повећану продукцију ROS удружену са оксидацијом протеина, липидном пероксидацијом, редукцијом антиоксидативног капацитета и дисфункцијом митохондрија (178). Значајан пораст формирања ROS, оксидативни стрес и смањена активност антиоксидативних ензима примећена је у мозгу мишева који су третираны наночестицама TiO₂, ZnO или Al₂O₃ (179). На основу података приказаних у литератури, чини се да је неуротоксичност металних наночестица повезана са индукцијом оксидативног стреса и нарушавањем деликатне редокс равнотеже и у неуронима и у глија ћелијама мозга. Такође, овај механизам може да буде повезан са генотоксичношћу и активацијом апоптотског пута (180).

Такође, кроз бројна истраживања је показано да наночестице метала и њихових оксида доводе до промена у понашању експерименталних животиња, која су удружена са претходно описаним патофизиолошким механизмима (127, 181-183).

1.3. Примена антиоксиданаса у превенцији оштећења изазваних нано-калцијум фосфатима

Са једне стране, наночестице показују одговарајуће пожељне особине за превентивну, дијагностичку и терапијску примену, док са друге стране узрокују токсичност живих ћелија, највероватније кроз индукцију апоптозе.

Бројне *in vitro* и *in vivo* студије доследно показују да наночестице индукују производњу ROS, узрокујући дисбаланс у оксидативном статусу, последично доводећи до оштећења ћелија. Чини се да стратегије које за циљ имају смањење оксидативног стреса могу бити значајне у даљем развоју алата за умањење токсичности заснованој на дејству наночестица у медицинској примени.

Како подаци из литературе упућују да је главни механизам оштећења под дејством нано-калцијум фосфата посредован оксидативним дисбалансом, чини се да би примена антиоксидативне суплементације, као начина за успостављање оксидативне равнотеже, могла да умањи споредне ефекте дуготрајног дејства наночестица калцијум фосфата, отпуштених из денталних композита.

Такође постоје докази да природни продукти са потврђеним антиоксидативним способностима, као што су куркумин (184) и екстракт цикорије (167), могу умањити штетно деловање хроничног уноса наночестица калцијум фосфата (96).

1.3.1. Антиоксидативна заштита

Оксидативни процеси представљају есенцијални механизам у ћелијама које се одржавају у аеробним условима. У овим процесима настају високо реактивна хемијска једињења која се називају слободни радикали и који у свом саставу могу садржати кисеоник, азот или сумпор (185-187). Такође, слободни радикали могу бити и егзогеног порекла и у ћелију доспети из спољашње средине (188). У ужем смислу оксидација представља хемијску реакцију којом се електрони отпуштају из оксидационог средства у околину. Реакције оксидације могу произвести слободне радикале, који започињу ланчане реакције којима се оштећују биомолекули ћелије (189).

Како се у метаболизму ћелија стално дешавају промене оксидативног статуса, које могу бити узроковане и егзогеним и ендогеним факторима, развијени су специфични механизми који успостављају равнотежу између два система. Са једне стране налазе се механизми који доводе до продукције слободних радикала, који имају потенцијал да реагују са различитим биомолекулима и доведу до оштећења структуре и функција ћелија, док је њима супротстављен сложени систем антиоксидативне заштите који тежи да елиминира дејство ових реактивних материја (190-192).

Антиоксиданси прекидају ланчане реакције уклањањем интермедијарних једињења у облику слободних радикала и инхибирају даљу оксидацију. Могу се дефинисати као супстанце које у релативно ниским концентрацијама значајно смањују оксидацију у ћелијама, односно супстанце које одлажу, превенирају или уклањају оксидативно оштећење на циљаном молекулу, а често су и сами редукциона средства (193).

Међу бројним начинима за класификовање антиоксидативне заштите један од најзначајнијих је према месту синтезе. У оваквој подели антиоксиданси и антиоксидативни системи сврставају се у ендогене и егзогене.

Ендогеним антиоксидативним системима припадају антиоксиданси који су укључени у антиоксидативну заштиту пореклом из самог организма. Егзогеним се називају антиоксиданти који се примарно не синтетишу у организму (194).

Услед континуираног генерисања реактивних кисеоничних врста у физиолошким метаболичким путевима, постоје бројни ензимски и неензимски антиоксидативни заштитни механизми укључени у ендегену антиоксидативну заштиту. Ензимски антиоксидативни заштитни механизми су засновани на ензимима примарне и секундарне антиоксидативне одрбране, међу којима су од највећег значаја каталаза (CAT) супероксид дисмутаза (SOD), глутатион редуктаза (GR), глутатион пероксидаза (GSH-Px) (195). Насупрот ензимској, неензимској антиоксидативној заштити припадају супстанце антоксидативног потенцијала, међу којима су витамини (А-ретинол, Е-токоферол и С- аскорбинска киселина), коензим Q-убихинон, бројни пептиди (глутатион (GSH)), азотна и друга једињења (196, 197).

У условима када ендегени антиоксидативни механизми самог организма нису компетентни да одговоре на захтеве постојећег стања, јавља се потреба за антиоксидативном суплементацијом, као третманом који треба да одржи ниским концентрације слободних радикала. Како се у ове сврхе користе егзогени антиоксиданси, у организам се најчешће уносе путем хране или медицинских препарата. Према пореклу егзогени антиоксиданси могу бити примарни - природни, или секундарни - синтетисани у лабораторији (198).

1.3.2. Природни антиоксиданси

Пракса коришћења сирових природних биљних производа за лечење различитих обољења траје већ хиљадама година, много пре развоја модерне медицине која укључује примену синтетских лекова и медикамената. Традиционална медицина се најчешће практикује без, али све чешће и са познавањем састава и природе активних молекула лековитих препарата. Заправо, опсежним претклиничким и клиничким студијама, до сада је показано да већина биљних производа делује као потенцијално терапијско средство у спречавању различитих обољења као што су дијабетес, неуролошке, кардиоваскуларне болести и тумори (199-201). Такође технолошки напредак омогућио је препознавање кључних активних састојака из природних извора и њихову примену као потенцијалних терапијских средстава. Управо због тога би идентификација и развој нових антиоксиданаса из природе могли бити корисни у ограничавању штетних ефеката оксидативног стреса у различитим патолошким процесима.

Природни антиоксиданти су једињења добијена из биљака и других живих организама са снажним потенцијалом да инхибирају оксидативни стрес контролишући стварање слободних радикала, уклањајући слободне радикале, прекидајући ланчане реакције посредоване слободним радикалима и спречавајући процес пероксидације липида. Дакле, природни антиоксиданти могу да уравнотеже оксидативни стрес и да обнове ћелијску хомеостазу (202). На овај начин антиоксидативна суплементација природним антиоксидансима може смањити штетне ефекте различитих патолошких стања изазваних оксидативним стресом. Носиоци биоактивних функција нутритијената су најчешће фенолна једињења, присутна претежно у воћу и поврћу, али и у неким већ прерађеним намирницама (203)

Природним продуктима способним да делују као антиоксиданси припадају:

1. Антиоксидативни минерали - делују као кофактор антиоксидативних ензима и укључују селен, бакар, гвожђе...
2. Антиоксидативни витамини - потребни за већину метаболичких функција тела, укључујући витамин С, витамин Е и витамин В
3. Фитохемијска једињења – која нису ни витамини ни минерали, а у које се сврставају и фенолна једињења укључујући и флавоноиде.

Међу природним продуктима са потврђеним антиоксидативним дејством налази се и екстракт биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim (FU) (203).

1.3.3. *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim

Filipendula ulmaria (L.) Maxim позната и под називом медуника је вишегодишња, зељаста биљка, распрострањена у Европи и Азији. Може се наћи у влажним регијама око бара и потока, као и на мочварним ливадама и ободима шума. (204).

У сврху лечења традиционално су коришћени сви делови биљке, првенствено у терапији различитих запаљенских процеса, посебно запаљења плућа али и у лечењу реуматизма и неуралгија (205). Медуника је најшире примењивана у лечењу обољења дигестивног тракта као средство за ублажавање тегоба гастритиса и желудачног чира са пратећим симптомима мучнине, горушице и стомачних болова. Чај ове биљке се користи у лечењу дијареје код деце, док се код одраслих примењује за снижавање телесне тежине (206). Биљка FU се као лековито средство често примењује за ублажавање симптома уринарног тракта, посебно код инфекција мокраћних путева, пошто као диуретик омогућава повећање клиренса и тиме поспешује рад бубрега (207) Традиционална медицина препознаје и благотворно дејство медунике у зарастању рана и лечењу чирева коже (208).

1.3.3.1. Фитохемијски садржај и биолошка активност биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim

Укупан састав као и садржај појединачних фитоједињења у биљном материјалу, уз познавање биохемијске активности доказаних једињења, указују на биолошке ефекте дејства испитиване биљне врсте или њених екстраката.

Анализом састава FU утврђен је висок садржај бројних биоактивних једињења. Најзначајнији припадају групи фенола, међу којима су салицилна киселина и деривати салицилне киселине (салицил алдехид, метил салицилат, бензил салицилат), флавоноиди и флавоноидни гликозиди (кверцетин, спиреозид, хиперозид, рутин, катехин и епикатехин) и танини (угозини и телимаграндини). Даље, фитохемијске анализе су показале да се у траговима у саставу екстраката различитих делова FU могу наћи и аскорбинска киселина, поликарбоксилне киселине и кумарин (204, 209).

Потврђен састав екстракта FU који укључује висок садржај укупних фенолних једињења објашњава, кроз литературу доказане, биолошке активности биљке FU. Тако кверцетин и рутин представљају два најпроученија флавоноида. Литературни подаци показују да је антиоксидативна способност кверцетин и рутин значајно изражена, за разлику од хесперидина који представља антиоксиданс благог дејства. Једним делом антиоксидативна активност ових флавоноида испољена је поништавањем дејства супероксид анјон радикала у реакцијама липидне пероксидације (210). Док је за кверцетин познато да смањује цитотоксичност и оксидацију липопротеина мале густине у макрофагима очувањем нивоа α -токоферола, чиме се одлаже почетак пероксидације липида (211). Заједно са другим улогама у метаболизму, кверцетин може да инхибира циклооксигеназу и липооксигеназу, док је код рутина такође доказана способност инхибиције липооксигеназе (212). Рутин је показивао и умерену превентивну активност у водоник-пероксид-индукованој оксидацији хемоглобина (213).

Испитивања фармаколошких активности самих екстраката FU показала су широк спектар биолошких ефеката, међу којима су најобимније истраживане антиоксидативна, антиинфламаторна и антимикробна активност.

1.3.3.1.1. Антиоксидативна активност

Антиоксидативни потенцијал представља једну од најважнијих биолошких активности биљака и биљних деривата, а ослања се на појединачно и синергичко дејство различитих фитохемијских једињења која се налазе у њиховом саставу. Како се у основи бројних патофизиолошких механизма често налази нарушавање оксидативне равнотеже са немогућношћу компензације ендогеним антиоксидативним механизмима, природни продукти са антиоксидативним способностима добијају значајну фармаколошку примену.

Показано је да је антиоксидативни потенцијал и антирадикалска активност екстракта биљке FU изузетана (203, 214), што се може приписати великом садржају полифенола (215, 216). Као што је поменуто, фенолна једињења, посебно флавоноиди, одговорна су за бројне биолошке ефекте који изазива примена FU, међу којима су и антиоксидативни. Феноли су способни да на различите начине зауставе реакције у којима слободни радикали оштећују ћелијске структуре, тако што директно реагују са ROS, активирају антиоксидативне ензиме, хелатирају метале, редукују α -токоферил радикале, инхибирају оксидазе, повећају количину мокраћне киселине, повећају антиоксидативне особине ниско-молекулских антиоксиданата (217).

Захваљујући учешћу оксидативних промена као иницијаторима или пропагаторима различитих патофизиолошких механизма, антиоксидативна способност фенола у саставу природних продуката је од изузетног значаја за њихову клиничку примену.

1.3.3.1.2. Антиинфламаторна активност

Резултати бројних истраживања водених и етанолних екстракта потврђују утицај FU на параметре који говоре о антиинфламаторној активности. До сада је потврђено да листови FU делују инхибиторно на биосинтезу простагландина (218). Такође, у испитивањима биоактивности, екстракт биљке FU показао је изузетан антиинфламаторни ефекат кроз инхибиторно дејство на активност COX-1 и посебно COX-2, док је утицај на експресију гена за циклооксигеназу незнатан. Истовремено показано је да екстракт FU значајно умањује знакове запаљена испољавањем антиноцицептивног и антиедематозног дејства (219, 220). Екстракти синтетисани од различитих делова биљке FU могу мењати и целуларни имунски одговор инхибиторним деловањем на активацију и пролиферацију Т-лимфоцита, док су ове промене повезане са генерацијом ROS (221). Такође потврђено је и да екстракт FU редукује продукцију IL-1, IL-6 и TNF- α (222), као и да се смањена производња инфламаторних цитокина одвија преко инхибиције NF- κ B протеинског комплекса (223).

1.3.3.1.3. Антимикробна активност

Антимикробно деловање ове биљке потврђено је резултатима бројних истраживања, којима је доказано да FU екстракт има антифунгицидно дејство на *Candida albicans*, као и бактерицидно на културе *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, што се може приписати високом садржају флавоноида и салицилне киселине (224). Такође, резултатима истраживања која су потврдила антибактеријску активност екстракта FU на *Helicobacter pylori* и *Campylobacter jejuni* може се објаснити традиционална примена FU у лечењу гастроинтестиналних обољења (225).

1.3.3.1.4. Антитуморска активност

У *in vitro* студијама потврђено је цитотоксично дејство екстракта FU на ћелијским линијама меланома, хуманим лимфобластоидним ћелијама (226) као и на ћелијама тумора плућа (227). Са друге стране екстракти FU су испољили и протективну улогу у механизмима оштећења ДНК, као значајног фактора у карциногенези (228).

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

На основу анализе резултата из литературе као и претходно разматраних података, дефинисани су циљеви истраживања:

1. Утврђивање бихевиоралних манифестација неуротоксичности након примене наночестица три различита једињења калцијум фосфата (хидроксиапатит, трикалцијум фосфат хидрат и аморфни калцијум фосфат) код пацова;
2. Утврђивање бихевиоралних манифестација неуротоксичности након симултане примене наночестица три различита једињења калцијум фосфата (хидроксиапатит, трикалцијум фосфат хидрат и аморфни калцијум фосфата) и екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. код пацова;
3. Утврђивање промена вредности параметара оксидативног стреса и апоптозе у ткиву мозга пацова третираних наночестицама калцијум фосфата самостално или са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.
4. Утврђивање промена садржаја BDNF и GABA А рецептора у ткиву мозга пацова третираних наночестицама калцијум фосфата самостално или са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Протоколи за третирање експерименталних животиња

3.1.1. Услови за чување животиња током експерименталних протокола

Експерименталне животиње су током трајања протокола чуване у контролисаним условима према критеријумима утврђеним у претходним истраживањима сличног типа (229-233), при чему су поштовани принципи и процедуре у складу са важећим етичким стандардима и ARRIVE протоколом, уз претходно обезбеђене сагласности тела и органа надлежних за спровођење етичких процедура.

3.1.2. Припрема екстракта

Екстракт биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. прављен од надземних делова биљке, као и квалитативно и квантитативно одређивање састава екстракта, су обављени према претходно описаној процедури (203).

3.1.3. Избор наночестица калцијум фосфата

Наночестице калцијум фосфата коришћене у студији добијене су од Sigma-Aldrich, Germany.

1. Наночестице хидроксиапатита: hydroxyapatite nanopowder, <200 nm particle size (BET), $\geq 97\%$, synthetic
2. Наночестице трикалцијум фосфат хидрата: tricalcium phosphate hydrate nanopowder, <200 nm particle size (BET)
3. Наночестице аморфног калцијум фосфата: calcium phosphate, amorphous nanopowder, <150 nm particle size (BET)

3.1.4. Протокол и дизајн истраживања

Истраживање је спроведено на 42 животиње које су биле распоређене у седам експерименталних група (6 животиња у групи):

1. контролна група – без третмана;
2. НА група – администрација наночестица хидроксиапатита у концентрацији од 17.8 mg/kg телесне масе;
3. ТСП група – администрација наночестица трикалцијум фосфат хидрата у концентрацији од 11 mg/kg телесне масе;
4. АСП група – администрација наночестица аморфног калцијум фосфата у концентрацији од 9.65 mg/kg телесне масе;
5. НА+FU група – администрација наночестица хидроксиапатита у концентрацији од 17.8 mg/kg телесне масе и екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. у концентрацији од 100 mg/kg телесне масе;
6. ТСП+FU група – администрација наночестица трикалцијум фосфат хидрата у концентрацији од 11 mg/kg телесне масе и екстракта биљке *Filipendula ulmaria* у концентрацији од 100 mg/kg телесне масе;
7. АСП+FU група – администрација наночестица аморфног калцијум фосфата у концентрацији од 9.65 mg/kg телесне масе и екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. у концентрацији од 100 mg/kg телесне масе.

Калцијум фосфати и екстракт биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. су примењени орално, растворени у води за пиће, континуирано током 30 дана, при чему је на дневном нивоу утврђиван дневни унос воде како би се омогућио прецизан дневни унос испитиваних супстанци у наведеним концентрацијама.

Студија је изведена са применом минималних доза нано-калцијум фосфата, што одговара резултатима претходних истраживања која су анализирали очекивано ослобађање нано-АСП из композитних испуна (27), као и минималним дозама нано-НА које су системском применом произвеле токсичне ефекте у другим системима органа (153). Даље, појединачне дозе минералних једињења, примењене у овој студији, изабране су као еквимоларне претходно наведеним параметрима за референтне вредности. Такође, изабрана је дневна доза екстракта биљке FU, сразмерна потврђеној вредности за оптималну биолошку ефикасност (203).

3.2. Испитивање бихевиоралних ефеката примењених протокола

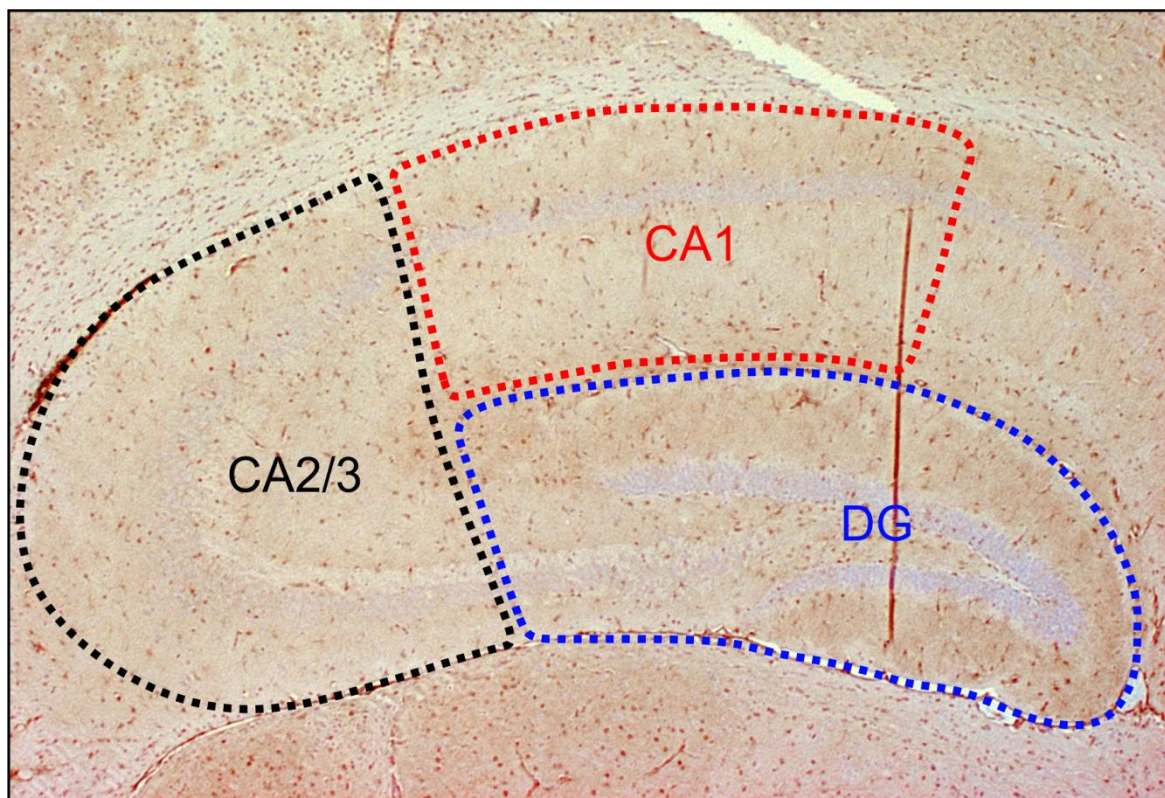
Бихевиорални ефекти примењених протокола су испитивани на батерији одговарајућих тестова (*open field* (OF) тест, *elevated plus maze* (EPM) тест, *tail suspension* (TS) тест, *novel object recognition* (NOR) тест, *hot plate* и *tail flick* тест), у складу са протоколом установљеним у ранијим студијама сличног типа (229-231, 233-236). Прецизан опис апаратура, техника и услова извођења тестова, методологије регистрација и анализе резултата тестова, као и параметара праћених у овим тестовима су публиковани у оквиру претходних студија (229-231, 233-236).

3.3. Узимање узорака možданог ткива (хипокампус и префронтални кортекс) за одређивање маркера оксидативног стреса и индикатора апоптотске активности

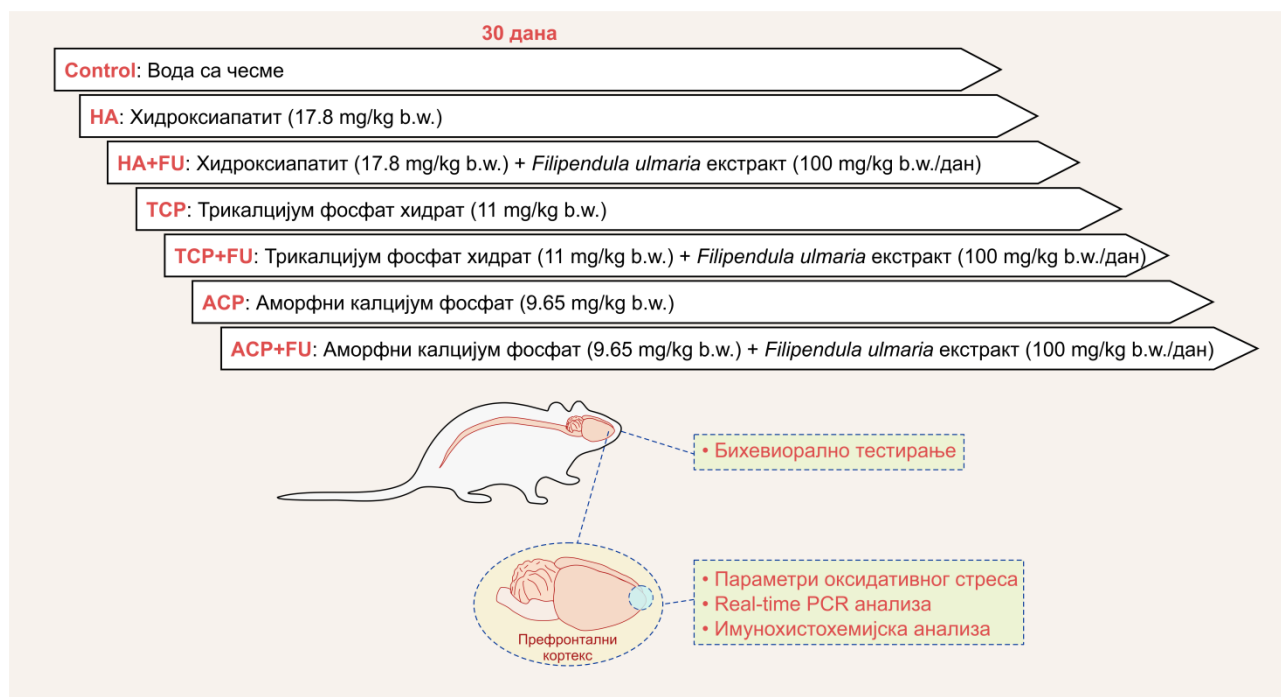
Након реализованог испитивања понашања животиња, спроведена је (по примени анестезије) процедура у циљу прикупљања узорака možданог ткива (хипокампус и префронтални кортекс) за одређивање маркера оксидативног стреса (индекс липидне пероксидације изражен као TBARS; активност супероксид дисмутазе – SOD; активност каталазе – CAT; укупни глутатион – GSH) и индикатора апоптотске активности (Bax, Bcl-2). Маркери оксидативног оштећења (229, 231, 235), као и апоптотске активности су одређивани према претходно описаној процедури (229,231, 235).

3.4. Квантитативна анализа BDNF и GABA-A рецептора у узорцима možданог ткива (хипокампус и префронтални кортекс)

Квантитативна анализа BDNF и GABA-A рецептора у узорцима možданог ткива (хипокампус и префронтални кортекс) је спроведена у форми утврђивања релативне генске експресије, односно имунохистохемијском методом, према процедури детаљно описаној у претходним студијама (234, 235).



Слика 3.1. Региони хипокампуса коришћени за имунохистохемијску анализу



3.2. Графички приказ дизајна студије

3.5. Статистичка обрада резултата

Статистичка обрада добијених резултата је реализована уз коришћење методологије дефинисане у претходним студијама (229-231, 234).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Резултати добијени бихевиоралним тестирањем

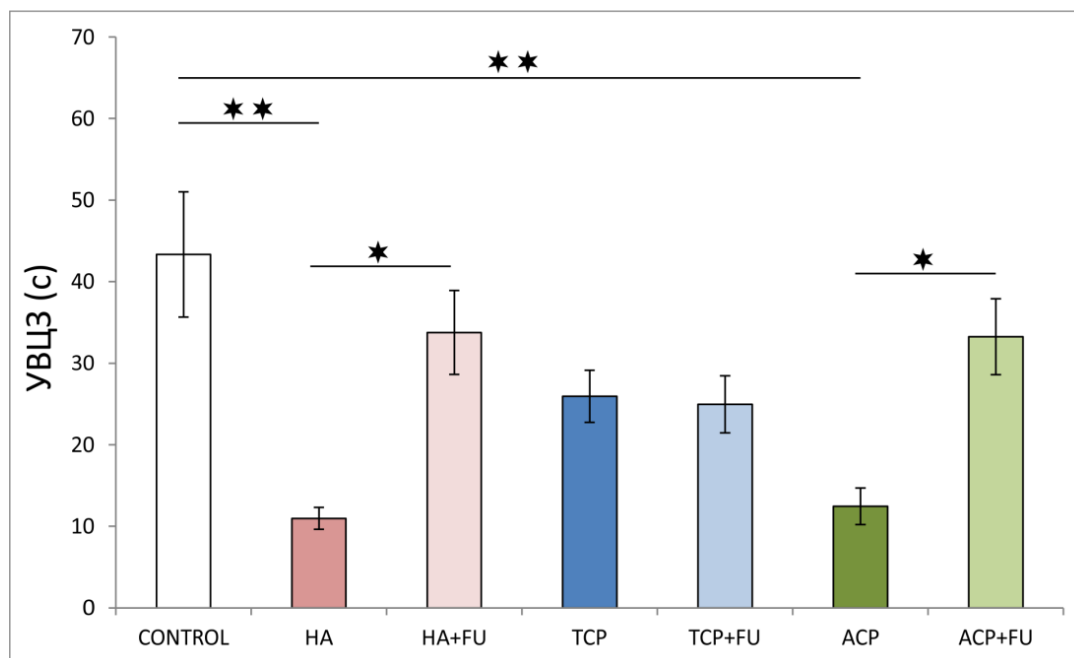
4.1.1. Промене параметара за процену анксиозности након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.

4.1.1.1. Промене параметара *open field* теста након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.

4.1.1.1.1. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене УВЦЗ током OF теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Протоколи спроведени у овој студији дали су значајне промене у вредности параметра УВЦЗ током OF теста ($F=7.033$, $df=6$).

Добијени резултати, приказани на Слици 4.1., показују да је самостална, дуготрајна примена наночестица НА и АСР узроковала значајно смањење вредности УВЦЗ параметра у односу на контролу ($p<0.01$). Такође, симултана примена нано-НА и АСР са екстрактом биљке FU одржала је вредности УВЦЗ параметра на нивоу контролних, док је у односу на самосталну примену истих калцијум фосфата уочено значајно повећање ($p<0.01$). УВЦЗ параметар OF теста није се мењао код животиња третираних ТСР, било при самосталној примени или удруженој са екстрактом биљке FU.

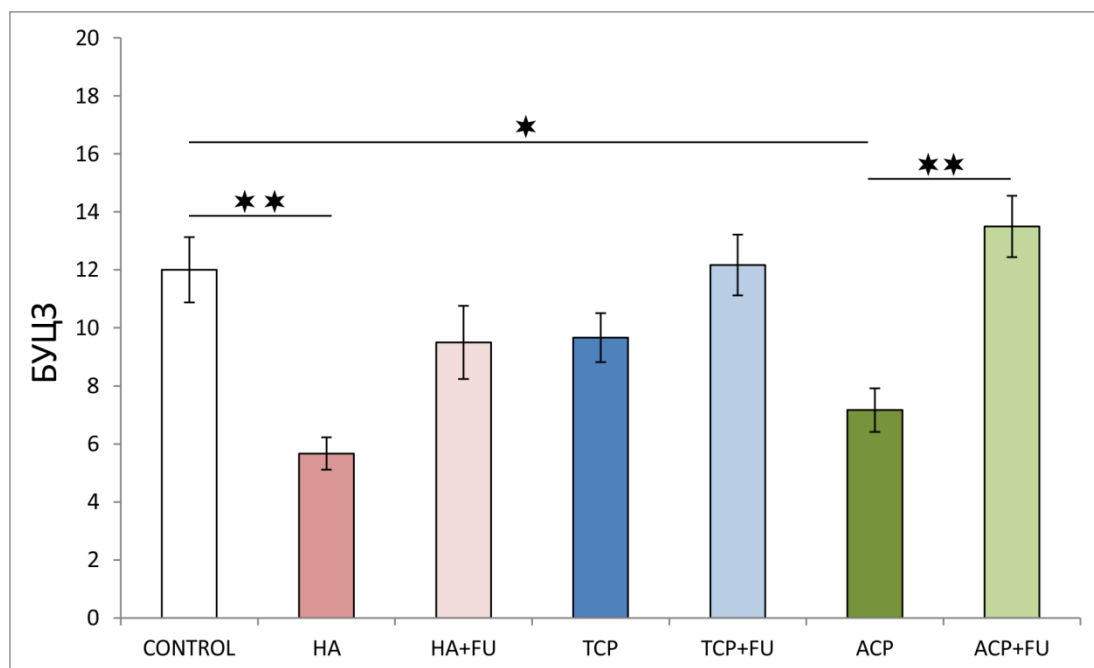


Слика 4.1. Промене параметра УВЦЗ током OF теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСР – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСР+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара ± стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.1.2. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене БУЦЗ током OF теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Примењени протоколи истраживања довели су до значајних промена у броју улазака у централну зону током OF теста ($F=8.445$, $df=6$).

Као што је приказано на Слици 4.2., у односу на контролне вредности примена нано-НА узроковала је значајније смањење броја улазака у централну зону OF теста ($p<0.01$) од третмана нано-АСР ($p<0.05$), док администрација нано-ТСП у овој студији није имала значајног ефекта. Суплементни третман екстрактом биљке FU утицао је да БУЦЗ остане непромењен у односу на контролу за све њиме третиране групе животиња. Са друге стране, у групи третираној екстрактом биљке FU и наночестицама АСР, уочено је значајно повећање вредност БУЦЗ у односу на АСР групу ($p<0.01$).

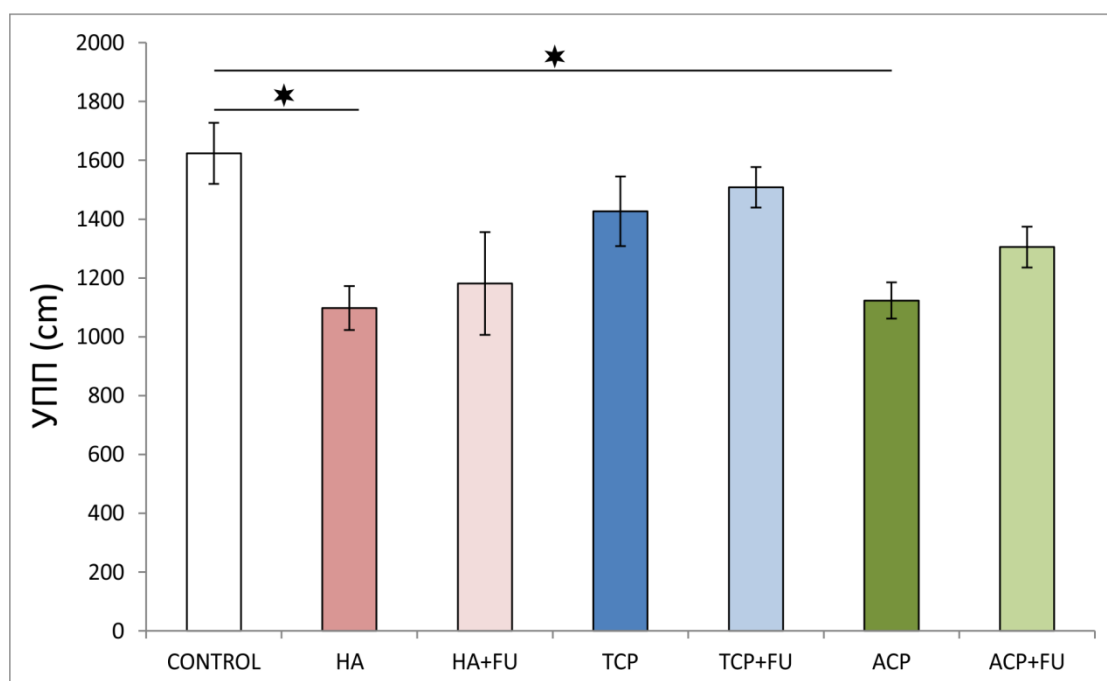


Слика 4.2. Промене параметра БУЦЗ током OF теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСП – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСП+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара ± стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.1.3. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене УПП током OF теста изазване наночестицама калцијум фосфата

УПП параметар значајно је промењен спроведеним протоколима студије ($F=3.879$, $df=6$). Вредности овог параметра приказане су на Слици 4.3.

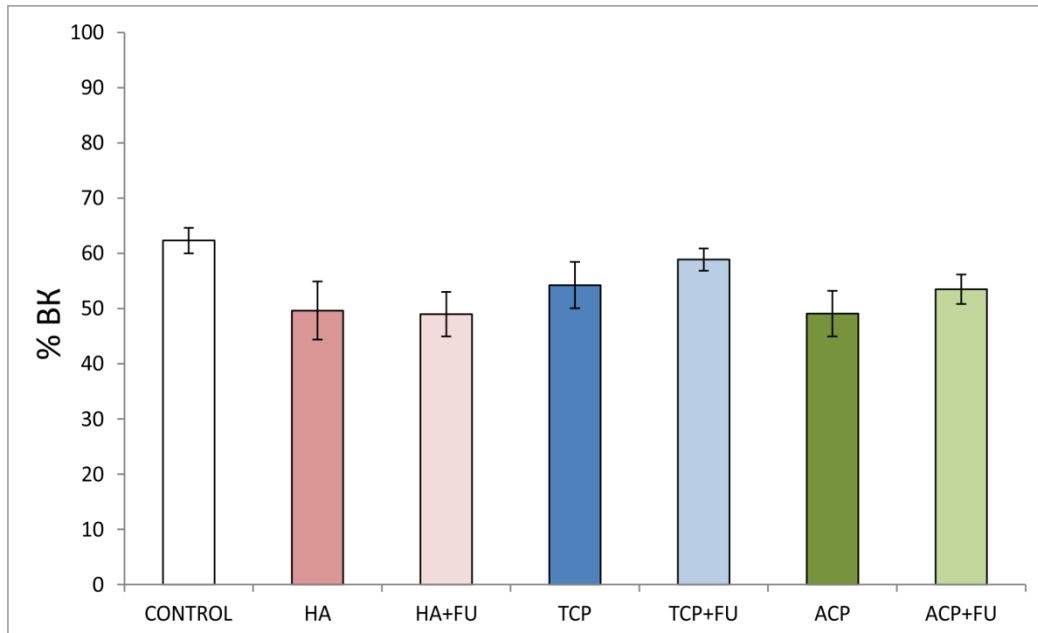
Смањење кретања у OF тесту, као показатеља анксиогеног одговора, потврђено је након примене НА и АСР наночестица ($p<0.05$), док сличне промене нису уочене при администрацији наночестица TCP. Заједнички третман екстрактом биљке FU и наночестицама калцијум фосфата очувао је вредности УПП параметра код све три испитиване групе животиња на нивоу контролних.



Слика 4.3. Промене параметра УПП током OF теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.1.4. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене процента времена кретања током OF теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Као што је приказано на Слици 4.4., протоколи спроведени у овој студији нису утицали на проценат времена кретања током OF теста ($F=1.979$, $df=6$).

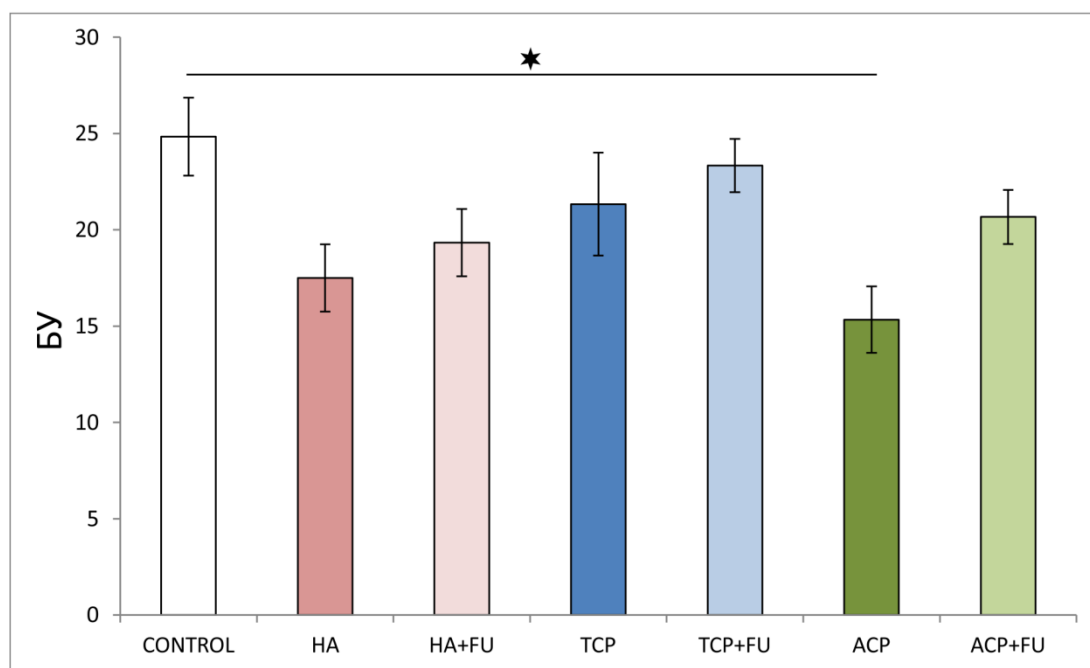


Слика 4.4. Промене процента времена кретања током OF теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.1.5. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене БУ током ОФ теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Примењени протоколи ове студије узроковали су значајне промене у броју усправљања током ОФ теста ($F=3.108$, $df=6$), што је приказано на Слици 4.5..

Анксиогени одговор на третман наночестицама калцијум фосфата, потврђен је значајним смањењем вредности БУ у АСР групи у поређењу са контролом ($p<0.01$), док се овај параметар није мењао у групама третираним наночестицама НА и ТСР. Антиоксидативним третманом, екстрактом биљке FU, очуване су вредности БУ у свим комбинованим групама на нивоу контролних.

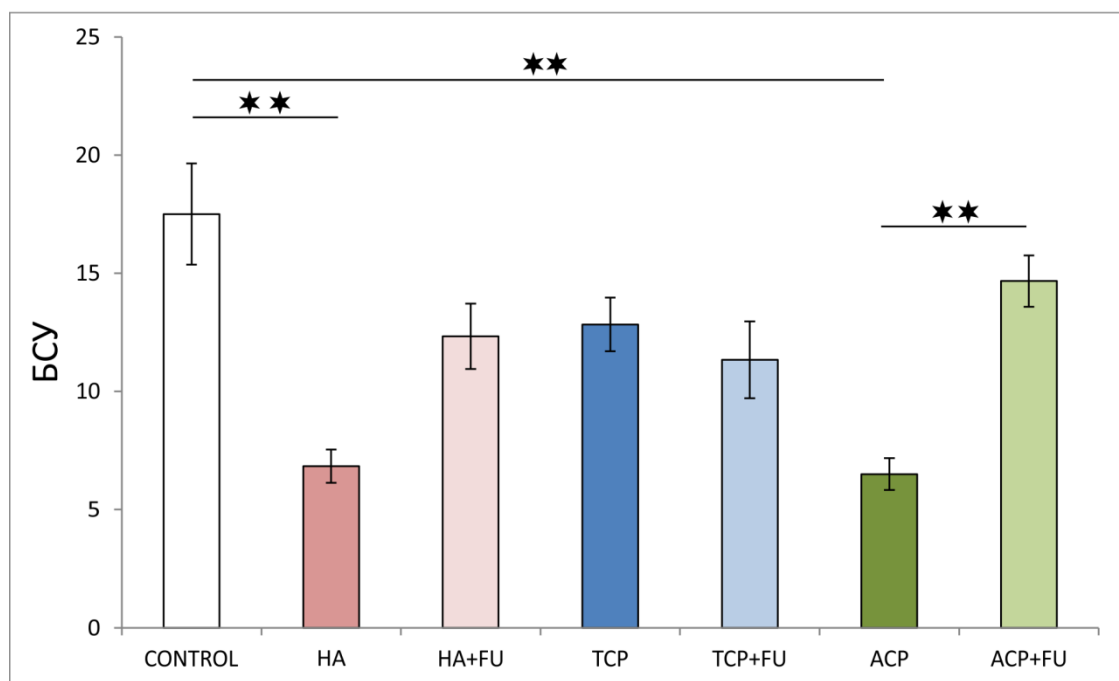


Слика 4.5. Промене параметра БУ током ОФ теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСР – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСР+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.1.6. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене БСУ током OF теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Број слободних усправљања током OF теста значајно је промењен протоколима примењеним у студији ($F=8.826$, $df=6$).

Као што је приказано на Слици 4.6., значајано смањење овог експлоративног индикатора примећено је након завршетка једномесечне примене наночестица НА ($p<0.01$) и АСР ($p<0.01$), без значајног ефекта при примени нано-ТСР. Међутим, додаток антиоксиданса успешно је смањио ову манифестацију анксиогеног одговора на примену нано-калцијум фосфата приближавајући вредности броја слободних усправљања контролним. Тако је поништено деловање нано-калцијум фосфата на БСУ параметар, са значајним повећањем вредности у АСР+FU у односу на АСР групу ($p<0.01$).

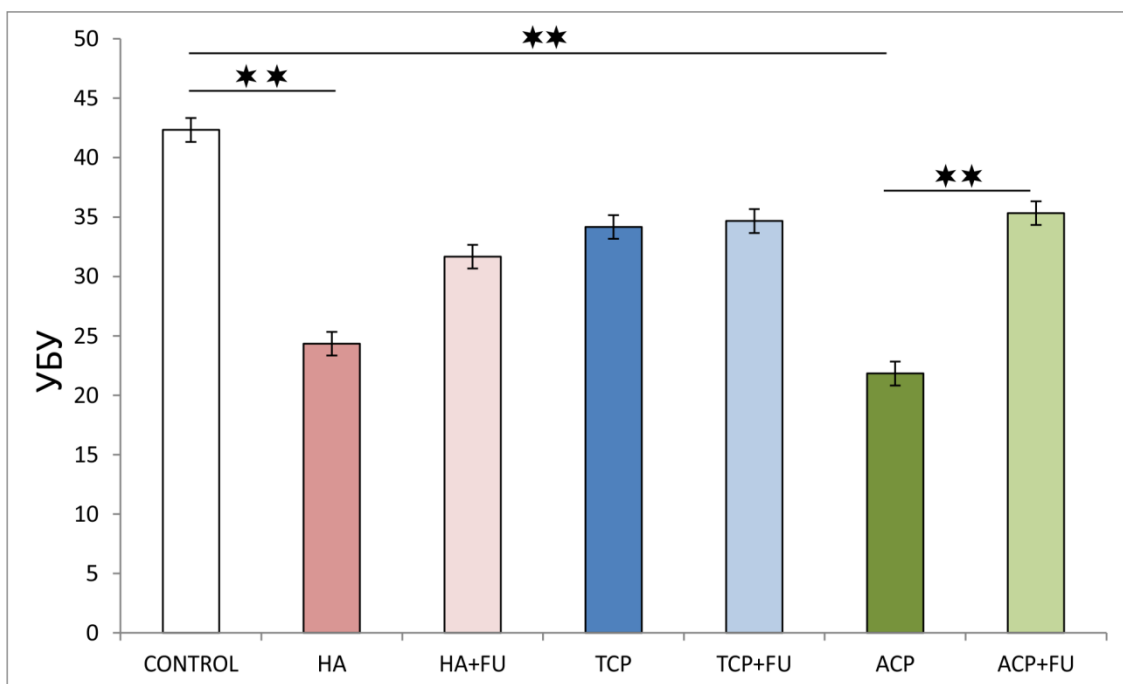


Слика 4.6. Промене параметра БУ током OF теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСР – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСР+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.1.7. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене УБУ током OF теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Као што је приказано на Слици 4.7., укупан број усправљања током OF теста значајно је промењен протоколима који су спроведени у студији ($F=8.686$, $df=6$).

У односу на контролу, третман наночестицама НА и АСР значајно је смањио укупан број уздицања током OF теста ($p < 0.01$), за разлику од примене нано-ТСП која није имала сличан утицај. Експлоративна активност, изражена кроз УБУ, након дуготрајне администрације све три врсте примењених нано-калцијум фосфата очувана је суплементацијом екстрактом биљке FU. Међутим, дејство антиоксиданса на укупан број усправљања било је најочљивије у АСР+FU групи, у којој је забележено значајно повећање вредности у односу на самостални третман наночестицама АСР ($p < 0.01$).



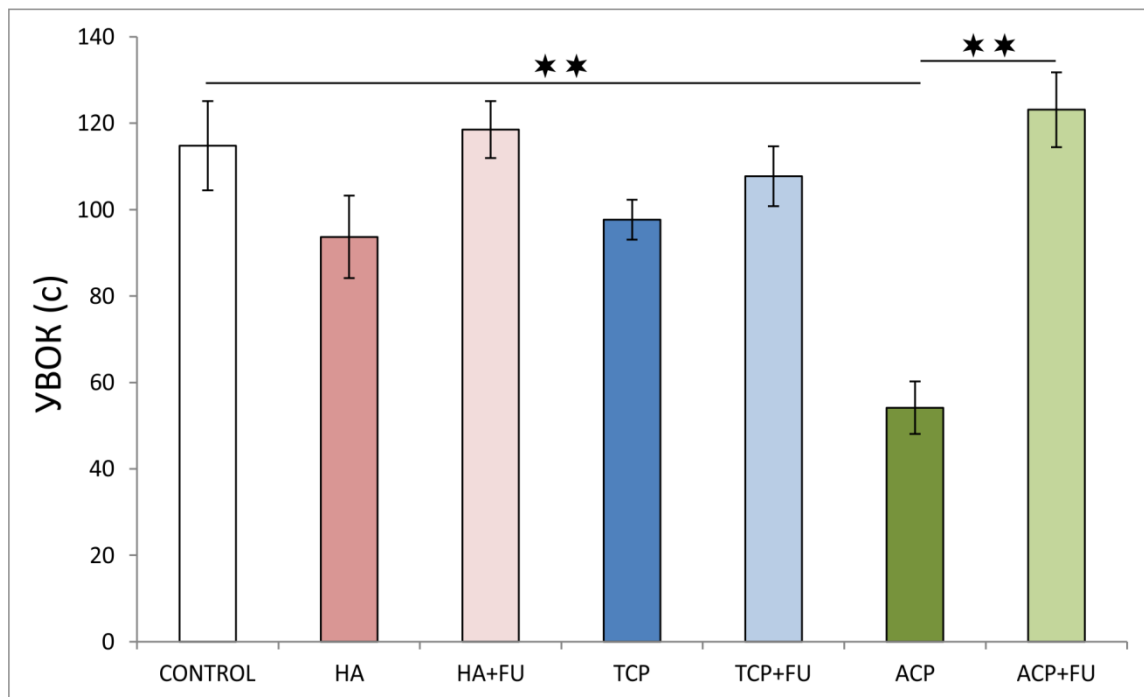
Слика 4.7. Промене параметра УБУ током OF теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСП – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСП+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.1.1.2. Промене параметара *elevated plus maze* теста након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.

4.1.1.2.1. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене УВОК током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Протоколи који су спроведени у овој студији довели су до значајне промене УВОК током ЕРМ теста ($F= 9.109$, $df=6$).

Резултати добијени у ЕРМ тесту показали су да је примена АСР нано-величине узроковала значајано смањење УВОК у односу на контролне вредности ($p<0.01$). Утицај АСР на укупно време које су пацови провели у отвореним крацима значајно је компензовано додатком екстракта биљке FU третману наночестицама АСР ($p<0.01$). Примена нано-НА и нано-ТСП, самостална или удружена са антиоксидативном суплементацијом, није имала утицаја на овај параметар за процену анксиозности, пошто су вредности УВОК у третираним групама очуване на нивоу контроле. Описане промене приказане су на Слици 4.8..

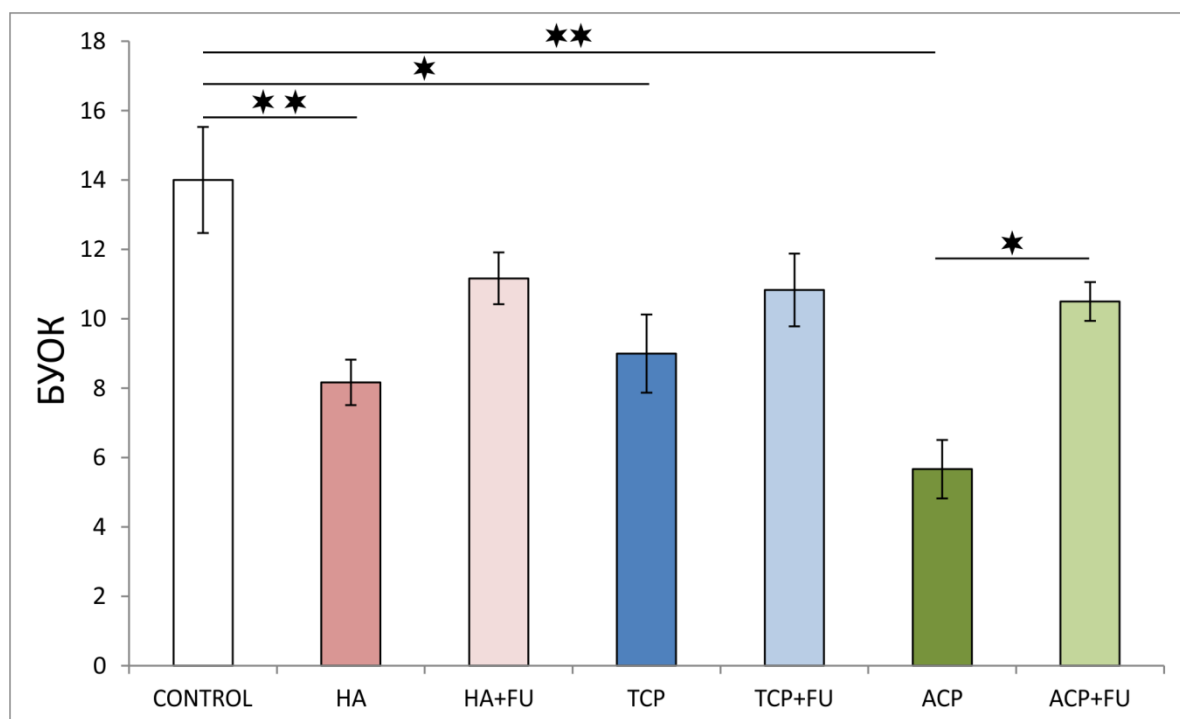


Слика 4.8. Промене параметра УВОК током ЕРМ теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСП – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСП+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.2.2. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене БУОК током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Број улазака у отворене краке током ЕРМ теста значајно је промењен протоколима спроведеног истраживања ($F=3.194$, $df=6$).

Као што је приказано на Слици 4.9., сва три примењена минерална једињења су смањила број улазака у отворене краке, међу којима су промене настале дејством наночестица НА и АСР биле значајније ($p<0.01$) у односу на оне настале применом нано-ТСП ($p<0.05$). Иако је примена екстракта биљке FU очувала вредности БУОК у нивоу контролних, ова манифестација анксиогеног одговора је у довољној мери поништена само након третмана наночестицама АСР ($p<0.05$).

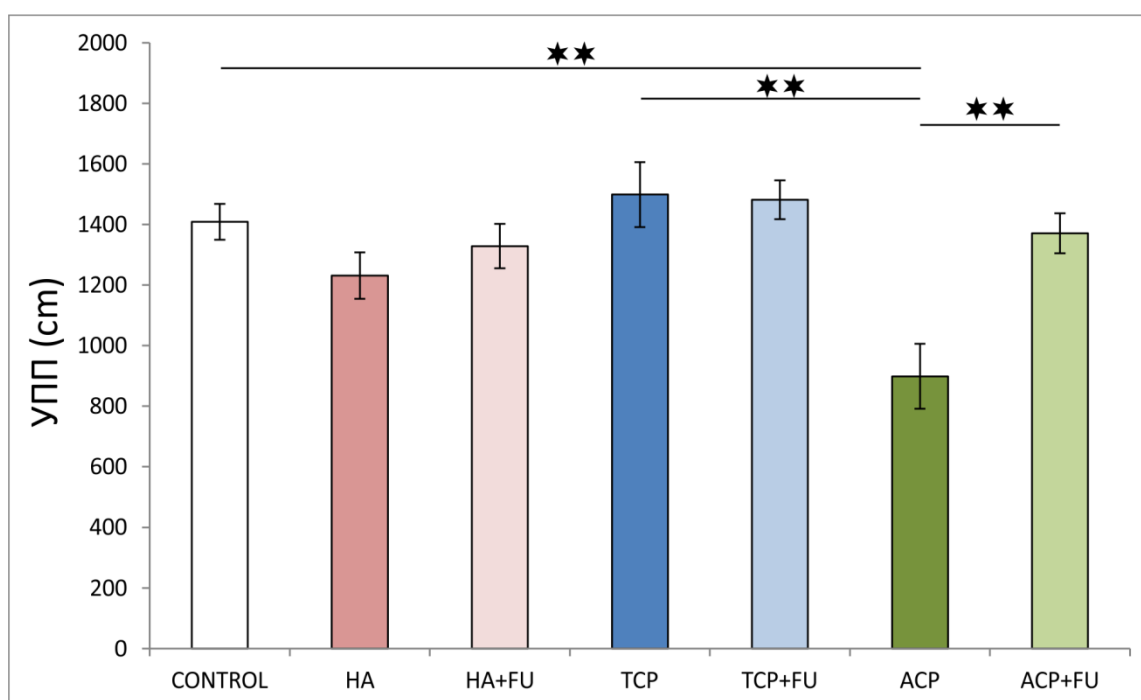


Слика 4.9. Промене параметра БУОК током ЕРМ теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСП – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСП+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара ± стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.2.3. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене УПП током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата

На Слици 4.10. приказани су вредности за укупан пређени пут током ЕРМ теста. УПП параметар ЕРМ теста значајно је промењен спроведеним протоколима студије ($F=3.879$, $df=6$).

У групи третираној наночестицама АСР уочава се значајно смањење укупног пређеног пута током тестирања у односу на контролну и ТСП групу ($p<0.01$). Како при самосталној примени наночестица НА и ТСП није било умањења вредности овог локомоторног индикатора, ефекат калцијум-фосфата на УПП поништен је антиоксидативним третманом само код истовремене примене екстракта биљке FU и наночестица АСР ($p<0.01$).

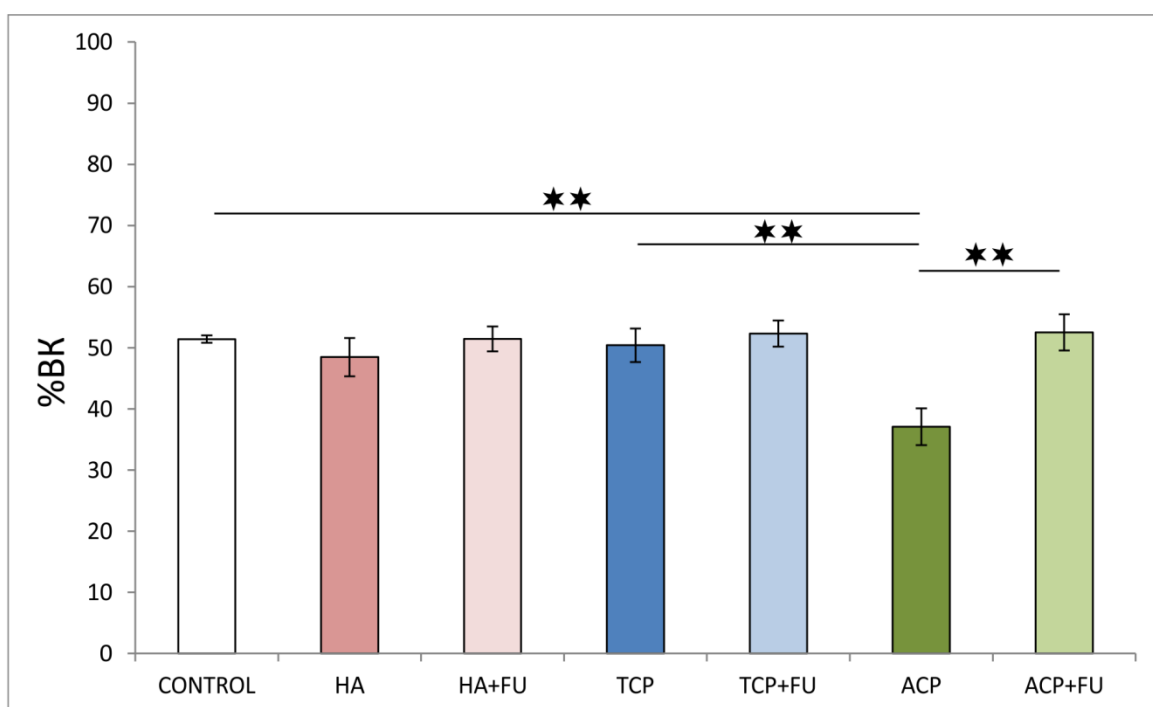


Слика 4.10. Промене параметра УПП током ЕРМ теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСП – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСП+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.2.4. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене %ВК током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Процент времена кретања, забележен у ЕРМ тесту, био је значајно промењен спроведеним протоколима истраживања ($F=1.979$, $df=6$).

Као што је приказано на Слици 4.11., део времена које су животиње провеле у кретању током ЕРМ теста није био промењен самосталном применом наночестица НА и ТСП, док је свакодневним уносом нано-АСР овај параметар локомоторне активности био редукован посебно према вредностима у контролној и ТСП групи ($p<0.01$). Са друге стране, дуготрајни антиоксидативни третман успео је да поништи штетно деловање наночестица АСР и очува вредности овог параметра значајно изнад забележених у АСР групи ($p<0.01$).

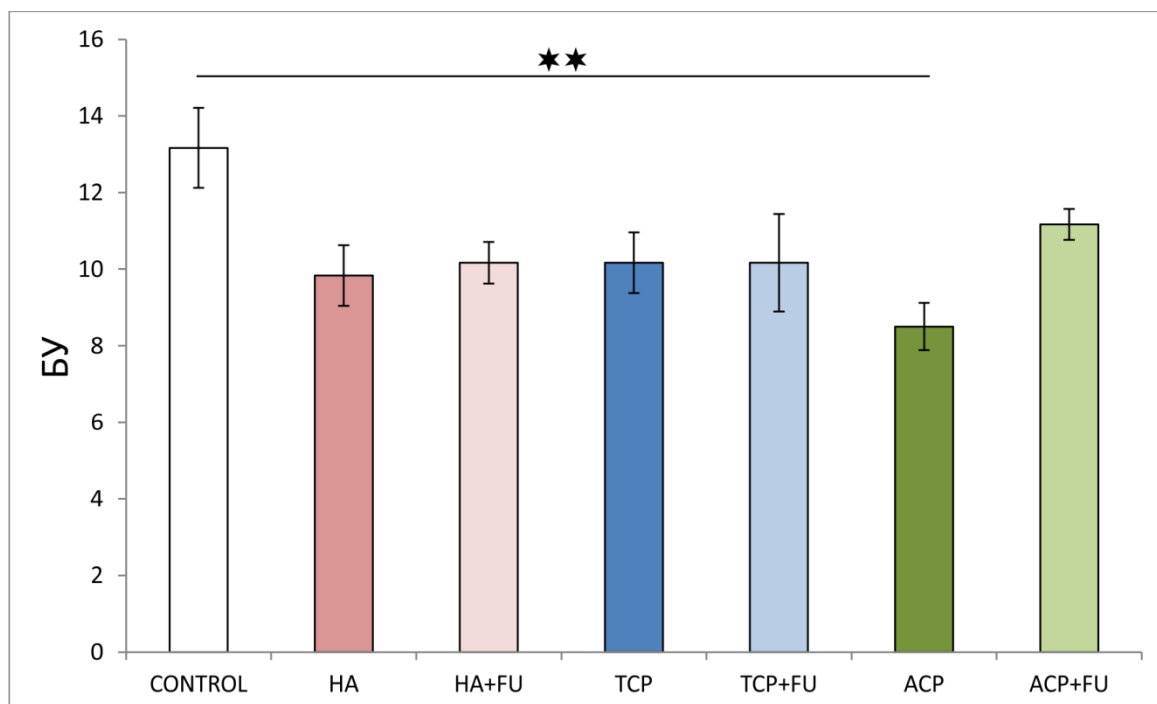


Слика 4.11. Промене параметра %ВК током ЕРМ теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСП – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСП+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.2.5. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене БУ током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Спроведени протоколи студије доводили су до значајне промене БУ током ЕРМ теста ($F=2.998$, $df=6$).

Као што је приказано на Слици 4.12. анксиогени одговор на самосталну примену наночестица АСР потврђен је значајним смањењем броја усправљања у поређењу са контролним вредностима ($p<0.01$), док други примењени протоколи нису утицали на овај параметар експлоративне активности.

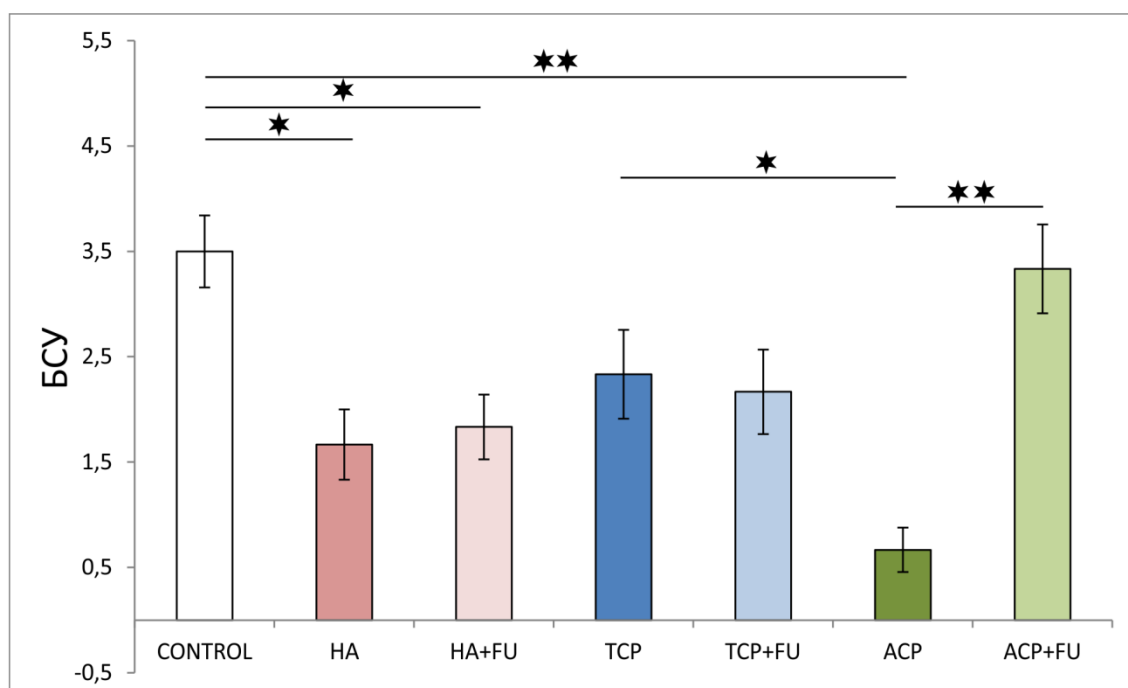


Слика 4.12. Промене параметра БУ током ЕРМ теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.2.6. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене БСУ током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Након примене протокола истраживања забележене су значајне промене у броју слободних усправљања током ЕРМ теста ($F=7.610$, $df=6$), што је приказано на Слици 4.13..

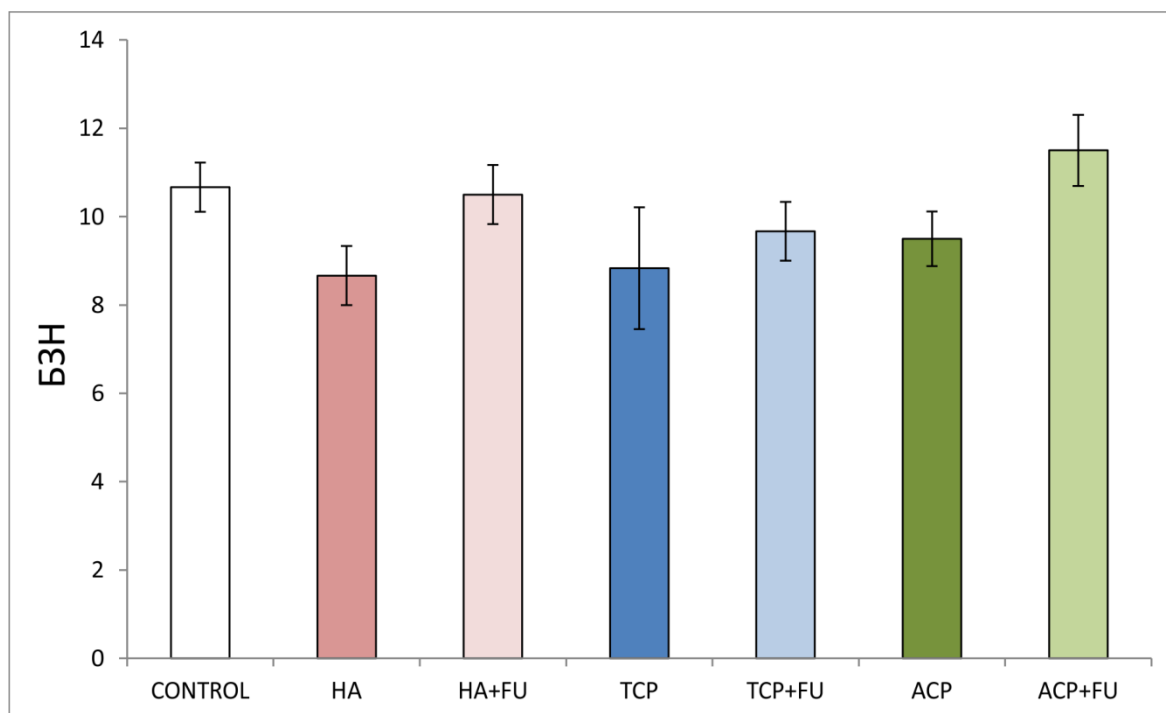
Истраживачка активност, изражена кроз вредности БСУ параметара, значајно је смањена једномесечном применом наночестица НА ($p<0.01$) и АСР ($p<0.05$), без значајног ефекта примене нано-ТСП. Снажан анксиогени одговор на нано-АСР није се манифестовао само у поређењу са контролним вредностима, већ и вредностима у ТСП групи ($p<0.05$), док је значајно смањење броја слободних усправљања према контроли уочено и након удружене примене наночестица НА и екстракта биљке FU ($p<0.05$). Слободно истраживање, редуковано узимањем наночестица АСР, успешно је надокнађено применом антиоксиданса ($p<0.01$).



Слика 4.13. Промене параметра БСУ током ЕРМ теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСП – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСП+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.2.7. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене БЗН током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Као што показује Слика 4.14. примењени протоколи нису дали промене броја заштићених нагињања током ЕРМ теста. ($F=1.626$, $df=6$)

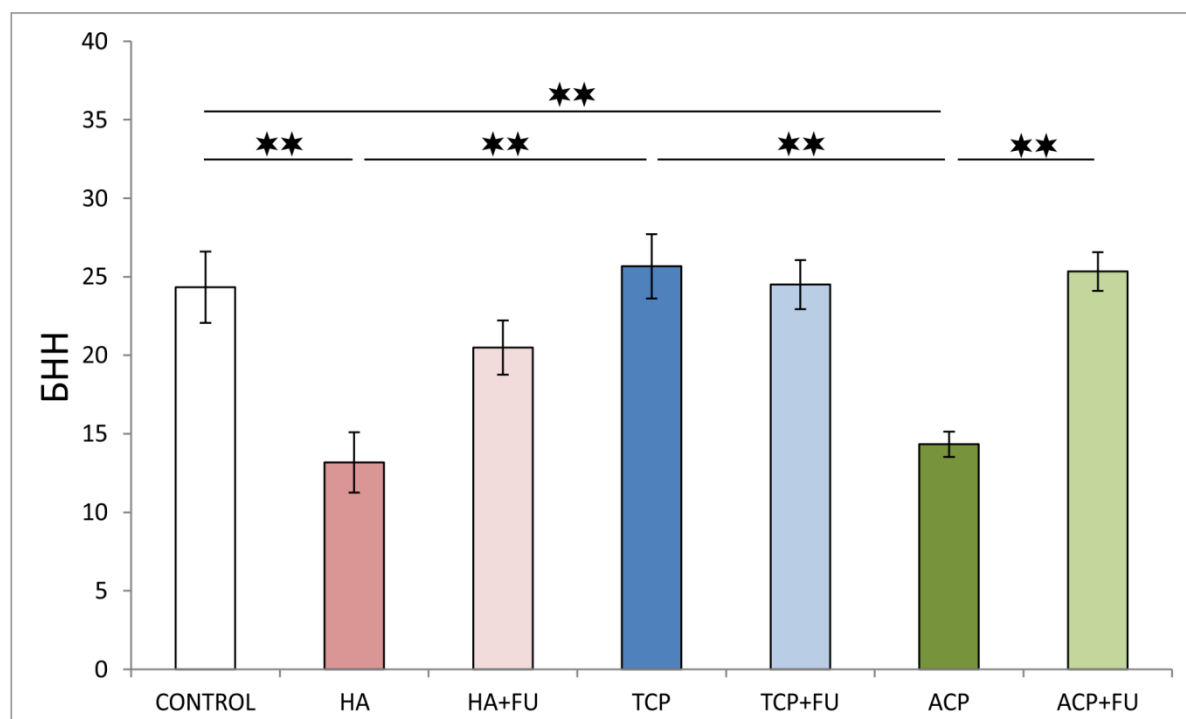


Слика 4.14. Промене параметра БЗН током ЕРМ теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.2.8. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене БНН током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Анксиогени одговор, изражен бројем незаштићених нагињана у отвореним крацима ЕРМ теста, значајно је промењен спроведеним протоколима студије ($F=9.603$, $df=6$).

Као што је приказано на Слици 4.15. примена наночестица НА и АСР довела је до значајног смањења овог истраживачког обрасца понашања у поређењу са контролом ($p<0.01$), као и са вредноста примећеним у ТСП групи ($p<0.01$). Истовремено, антиоксидативна суплементација умањила је ову манифестацију анксиогеног одговора при третману нано-АСР ($p<0.01$), изједначавајући вредности са контролним.

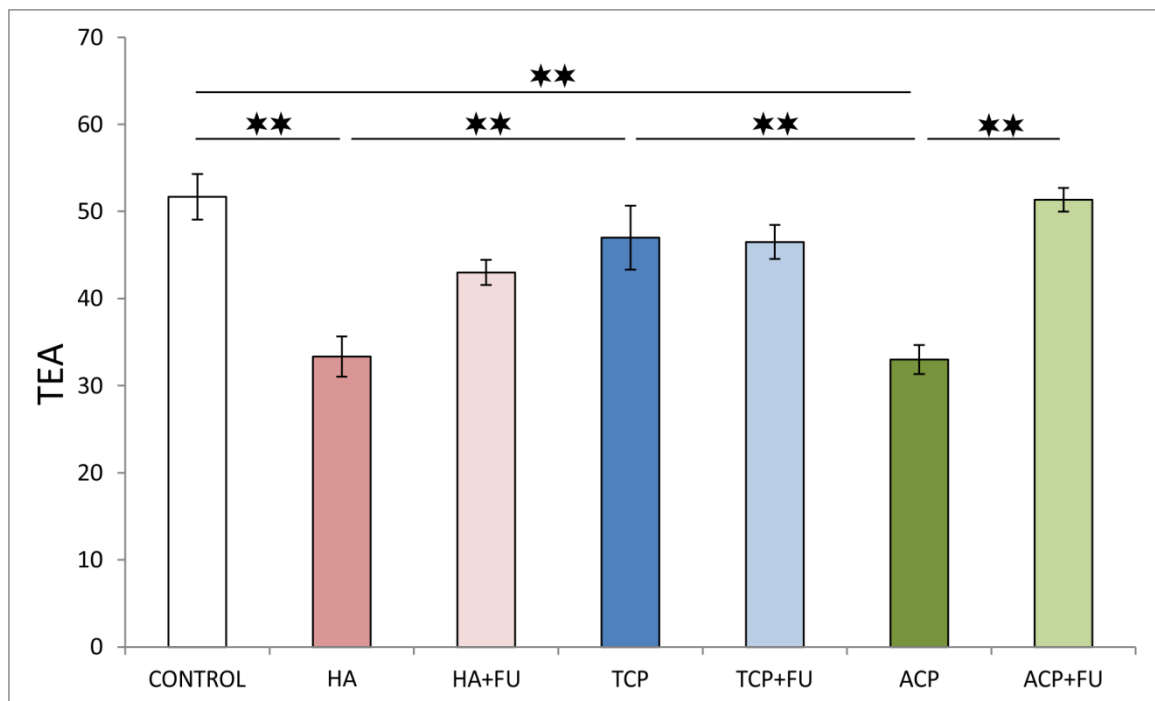


Слика 4.15. Промене параметра БНН током ЕРМ теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСП – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСП+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.2.9. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене броја ТЕА епизода током ЕРМ теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Према вредностима приказаним на Слици 4.16. уочава се да су примењени протоколи студије значајно утицали на број ТЕА епизода током ЕРМ теста ($F=11.723$, $df=6$).

Резултати спроведеног истраживања су показали да је хронична администрација наночестица НА и АСР изазвала значајно смањење укупног броја епизода експлоративне активности у ЕРМ тесту ($p<0.01$). Такође, број ТЕА епизода значајно је смањен у НА и АСР групи у поређењу са вредностима у ТСП групи ($p<0.01$). Додавање екстракта биљке FU третману нано-калцијум фосфатима успешно је неутралисало ове манифестације анксиогеног одговора изазване НА и АСР наночестицама ($p<0.01$).



Слика 4.16. Промене броја ТЕА епизода током ЕРМ теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСП – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСП+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара ± стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

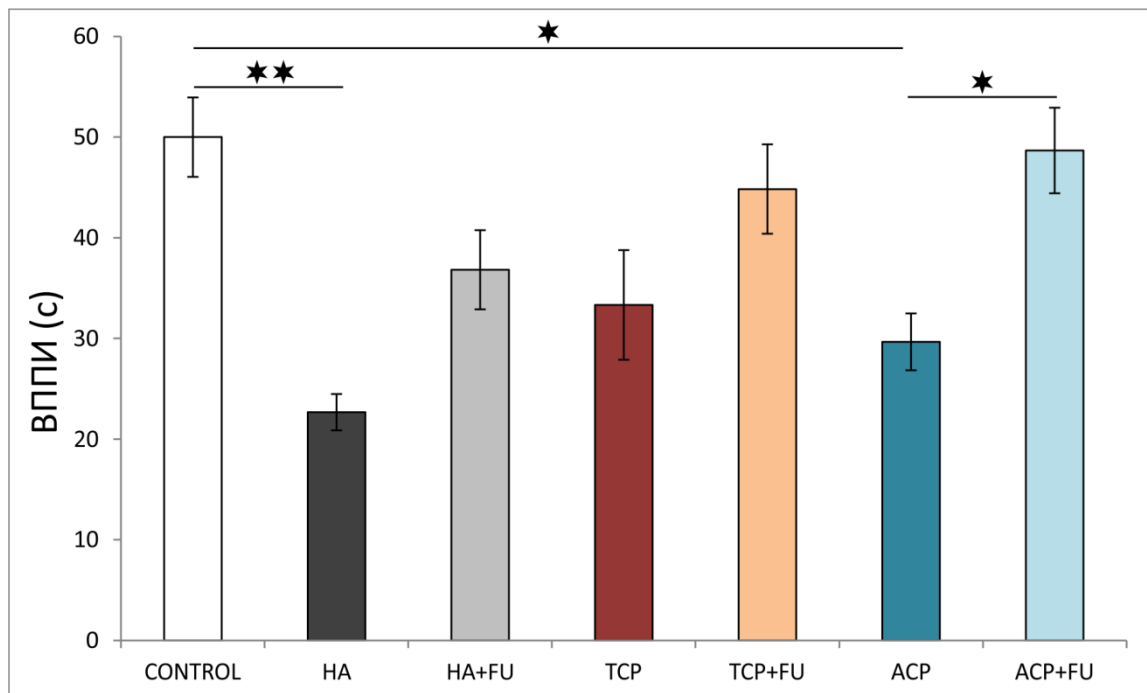
4.1.3. Промене параметара за процену нивоа депресивности након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.

4.1.3.1. Промене параметара *tail suspension* теста након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim

4.1.3.1.1. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене ВППИ током TS теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Резултати добијени током теста качења за реп потврђују да су примењени протоколи довели до значајне промене латенције до прве имобилности ($F=6.731$, $df=6$).

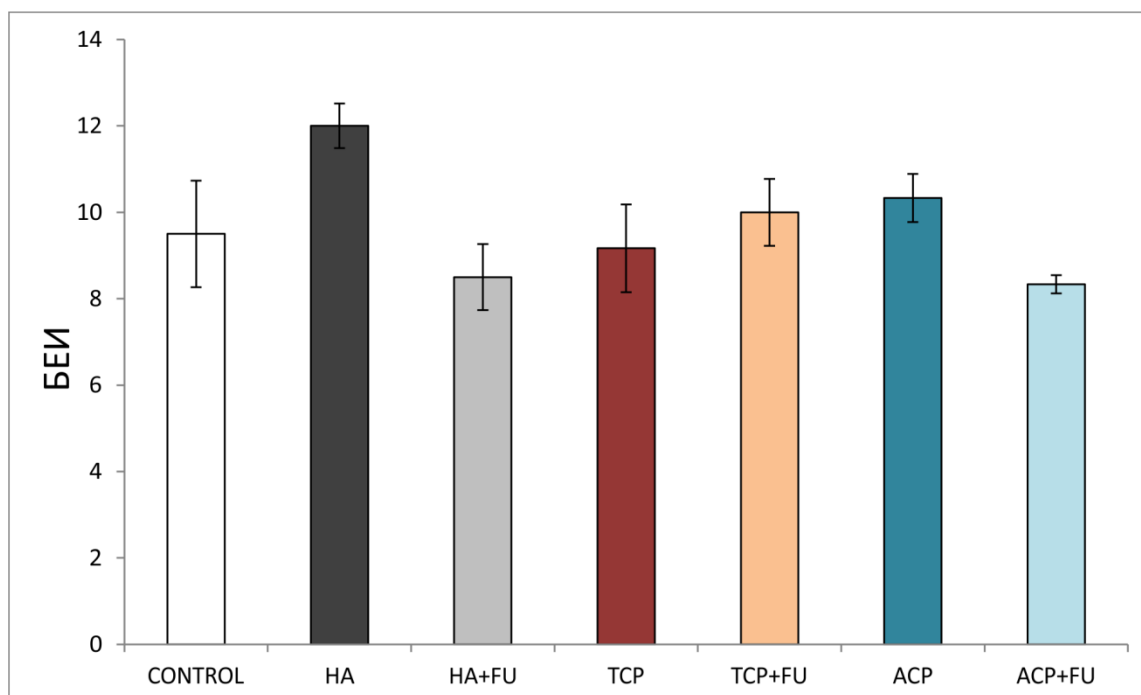
Као што је приказано на Слици 4.17., хронични, орални унос наночестица калцијум фосфата значајно је смањио време до прве имобилности у НА ($p<0.01$) и АСП групи ($p<0.05$) у односу на контролу. Међутим, ово продепресантно деловање оба нано-калцијум фосфата успешно је спречено додавањем екстракта биљке FU. Повећање ВППИ на ниво контролне вредности уочено је и у НА+FU и у АСП+FU групи ($p<0.05$), а за АСП+FU групу и у поређењу са групом која је примала само нано-АСП ($p<0.05$). Примена наночестица ТСП, самостално или удружено са екстрактом биљке FU, није мењала вредност овог параметра за процену депресивности.



Слика 4.17. Промене параметра ВППИ током TS теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСП – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСП – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСП+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСП+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.3.1.2. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене БЕИ током TS теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Као што показује Слика 4.18. ниједан од примењених протокола није значајно утицао на број епизода имобилности током TS теста. ($F=2.524$, $df=6$)

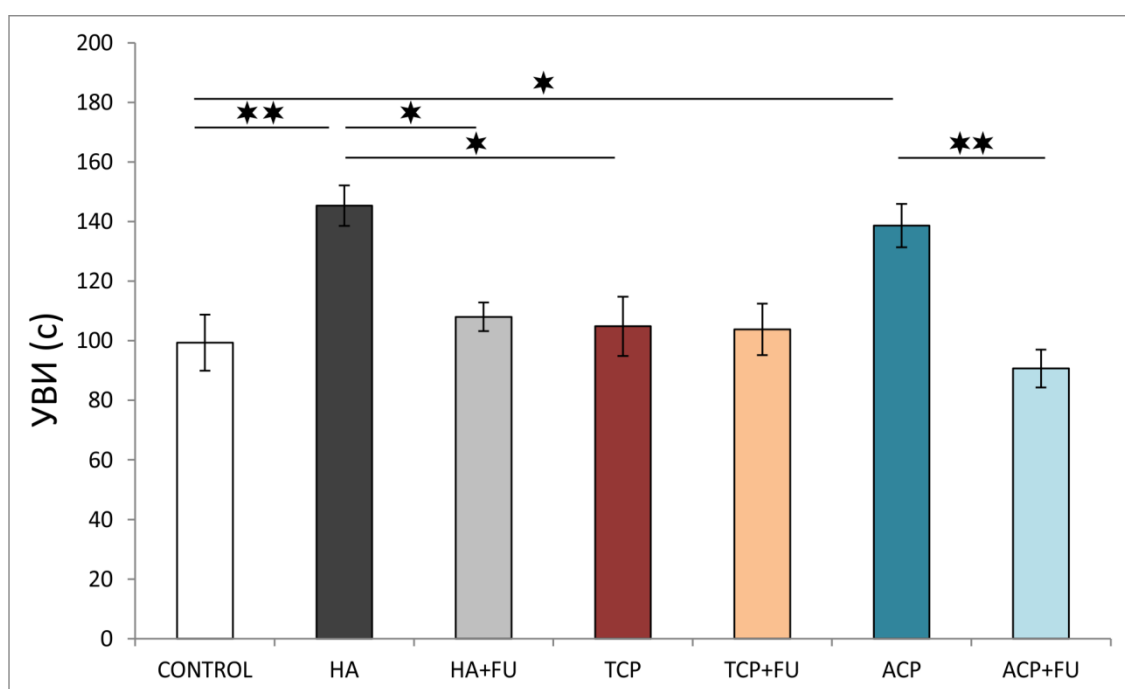


Слика 4.18. Промене параметра БЕИ током TS теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.3.1.3. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене УВИ током TS теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Примењени протоколи студије значајно су променили укупно време имобилности током TS теста ($F=7.031$, $df=6$), као што је приказано на Слици 4.19..

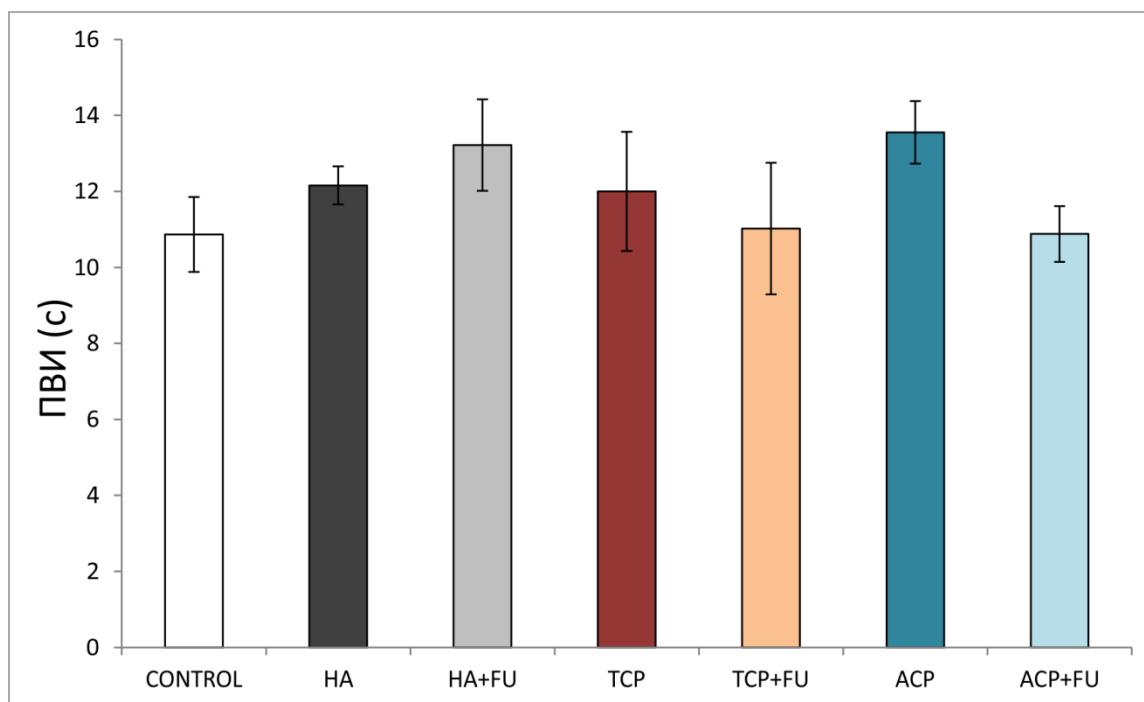
Појединачна примена нано-калцијум фосфата имала је различит утицај на укупно трајање непокретности испитиваних животиња. У поређењу са контролом, примена нано-НА и АСР значајно је повећала УВИ маркер депресивности ($p<0.01$ за нано-НА и $p<0.05$ за нано-АСР), док примена нано-ТСП није имала сличан ефекат. Такође вредност УВИ била је значајно већа у НА него у ТСП групи ($p<0.05$). Удружено дејство екстракта биљке FU и сва три нано-калцијум фосфата довело је до одржавања дужине трајања имобилности на нивоу контроле, а значајно краће у НА+FU него у НА групи ($p<0.05$) и АСР+FU него у АСР групи ($p<0.01$).



Слика 4.19. Промене параметра УВИ током TS теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСП – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСП+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.3.1.4. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене ПВИ током TS теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Као што показује Слика 4.20., примењени протоколи нису дали промене у ПВИ параметру током TS теста ($F=0.925$, $df=6$)



Слика 4.20. Промене параметра ПВИ током TS теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

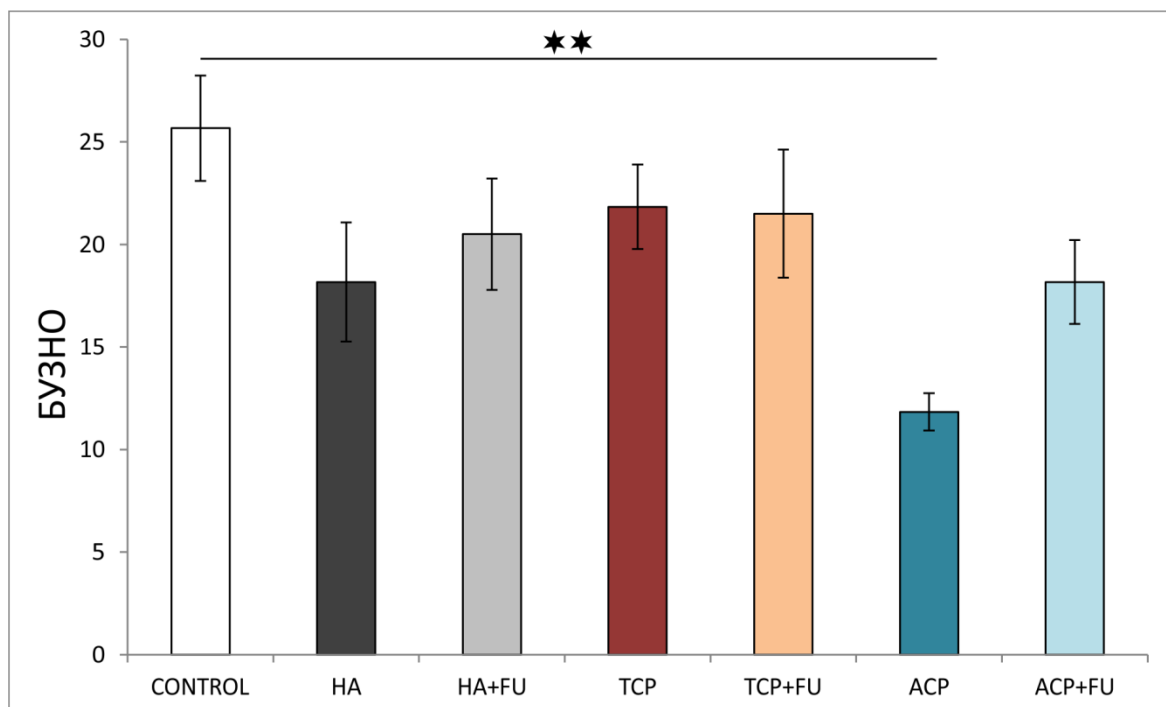
4.1.4. Промене параметара за процену когнитивних функција након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.

4.1.4.1. Промене параметара *novel object recognition* теста након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim

4.1.4.1.1. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене БУЗНО током NOR теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Испитивање когнитивних способности, помоћу NOR теста, показало је значајно смањење БУЗНО узроковано спроведеним протоколима студије ($F=3.123$, $df=6$).

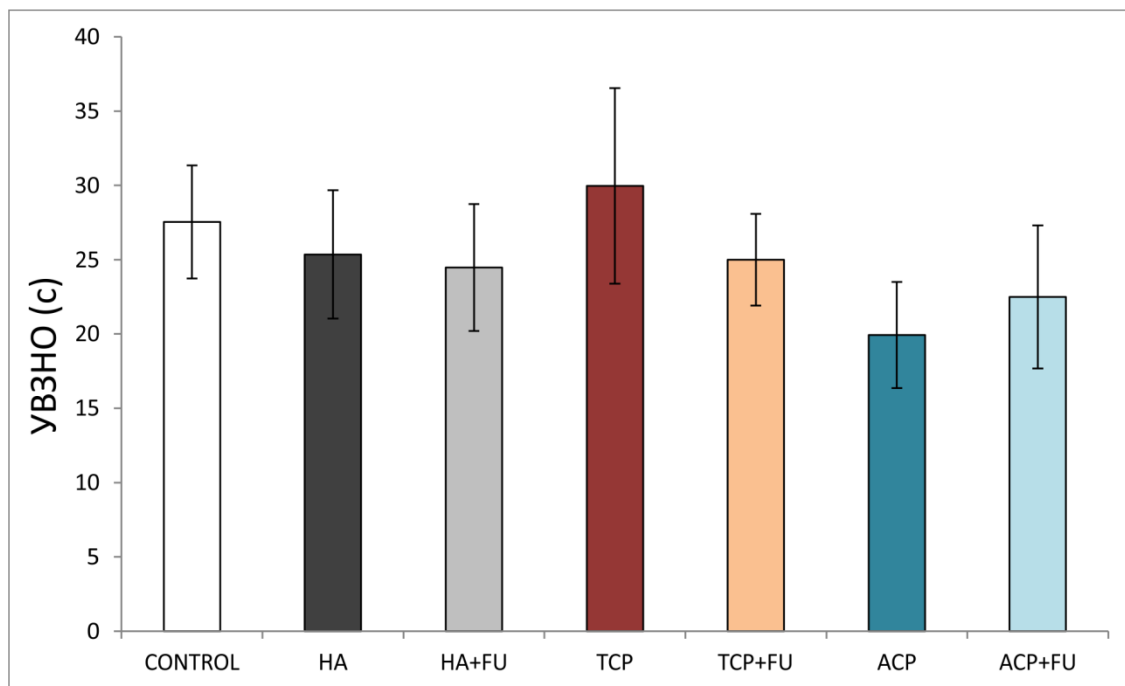
Као што се уочава на Слици 4.21. резултати NOR теста показују да је примена наночестица АСР значајно смањила број улазака у зону новог објекта у поређењу са контролним вредностима ($p<0.01$), док у осталим испитиваним групама ове промене нису уочене. Примена екстракта биљке FU, као антиоксиданса, очувала је вредности БУЗНО параметра у свим испитиваним групама, без значајне разлике у односу на групе које су третиране само наночестицама калцијум фосфата.



Слика 4.21. Промене параметра БУЗНО током NOR теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, $*p<0.05$, $**p<0.01$.

4.1.4.1.2. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене УВЗНО током NOR теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Као што показује Слика 4.22. примењени протоколи нису изазвали промене у УВЗНО параметру током NOR теста. ($F=0.529$, $df=6$)

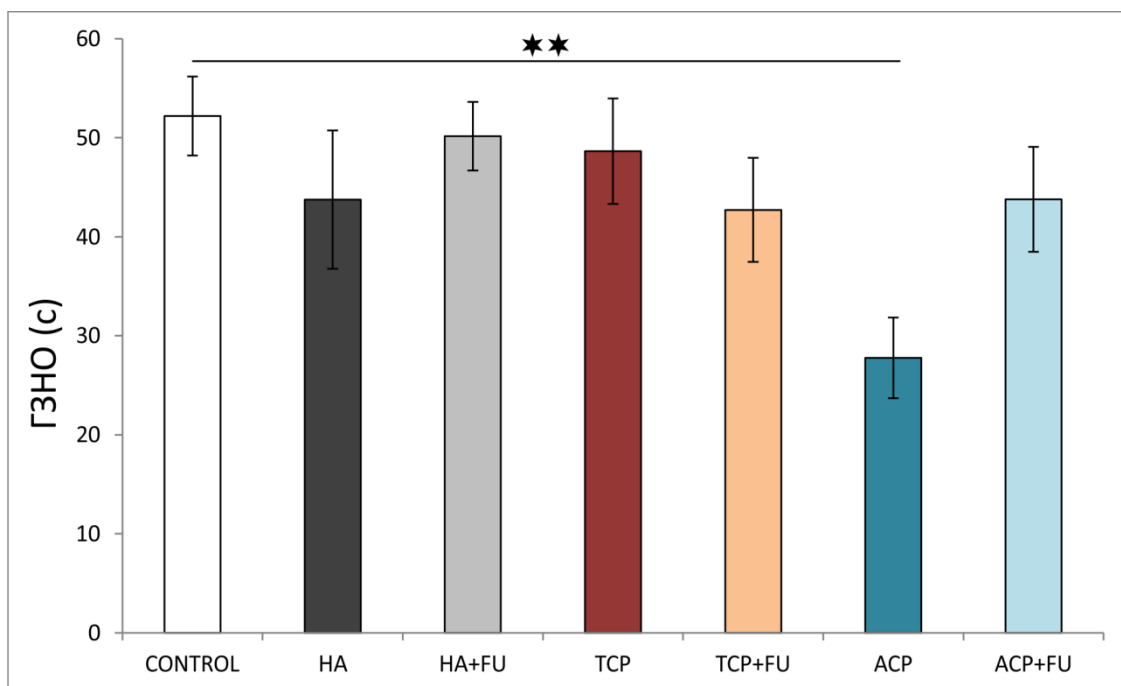


Слика 4.22. Промене параметра УВЗНО током NOR теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, $*p<0.05$, $**p<0.01$.

4.1.4.1.3. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене ГЗНО током NOR теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Дуготрајна примена протокола студије значајно је утицала на време које су пацови провели главом окренути ка новом објекту ($F=2.578$, $df=6$).

Примена нано-АСР значајно је смањила вредности ГЗНО у односу на контролне ($p<0.01$), без уочених разлика у вредностима овог параметра након примене осталих протокола студије. Повољан ефекат антиоксидативне суплементације екстрактом биљке FU у превенцији когнитивних оштећења, испољен је одржавањем вредности ГЗНО у АСР+FU групи на нивоу контроле. (Слика 4.23.).



Слика 4.23. Промене параметра ГЗНО током NOR теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

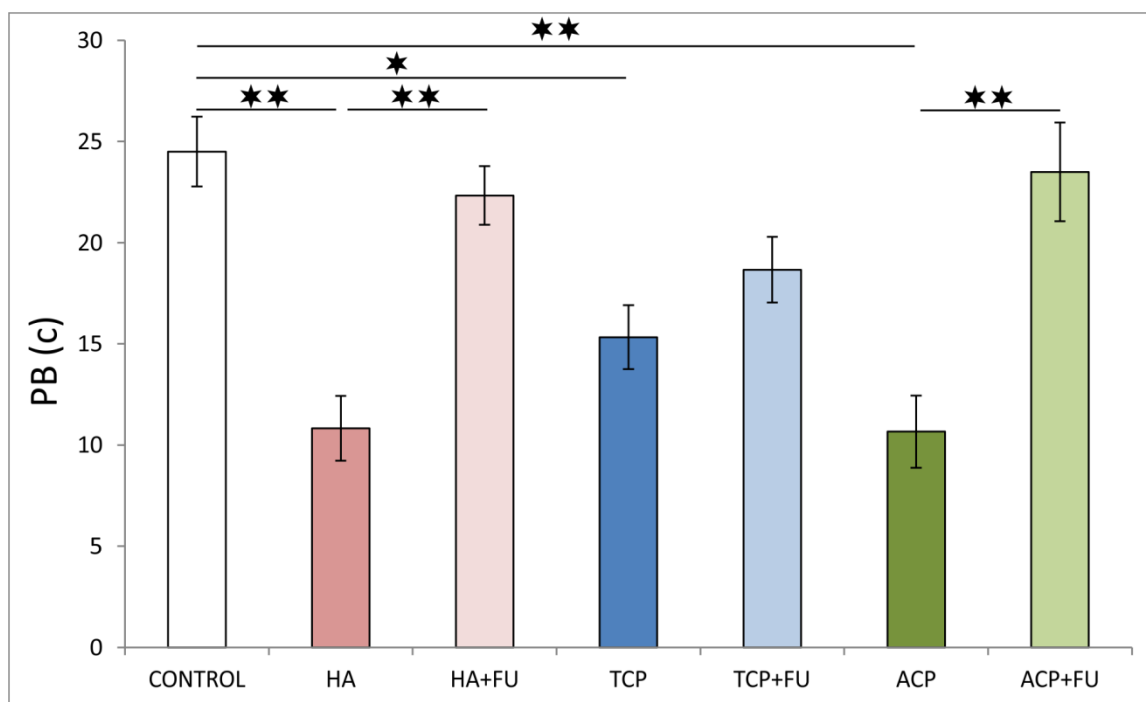
4.1.5. Промене параметара за процену ноцицепције након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.

4.1.5.1. Промене параметара *tail flick* теста након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim

4.1.5.1.1. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене РВ током *tail flick* теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Као што је приказано на Слици 4.24., резултати *tail flick* теста показали су значајне промене у времену реаговања након примењених протокола студије ($F=10.863$, $df=6$).

Време до реакције током *tail flick* теста било је значајно смањено за све три групе које су добиле само нано-калцијум фосфате ($p<0.01$ за нано-НА и АСР; $p<0.05$ за нано-ТСР). Примена екстракте биљке FU деловала је протективно на испитиване механизме ноцицепције одржавајући вредности реакционог времена на нивоу контролних у све три комбиноване групе. Такође, додатак антиоксиданса третману наночестицама НА и АСР, резултирао је значајним продужењем реакционог времена у поређењу са групама третираним самостално нано-калцијум фосфатима ($p<0.01$).



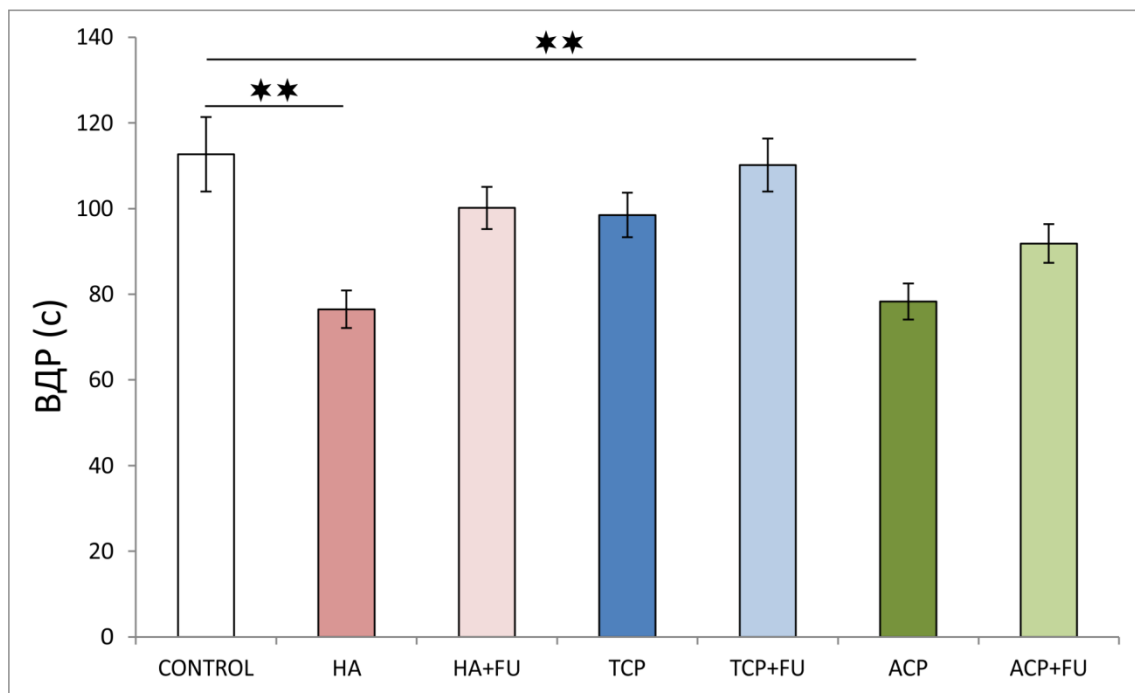
Слика 4.24. Промене параметра РВ током *tail flick* теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСР – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСР+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.5.2. Промене параметара *hot plate* теста након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim

4.1.5.2.1. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене ВДР током *hot plate* теста изазване наночестицама калцијум фосфата

Примењени протоколи значајно су утицали на време до реакције у *hot plate* тесту (Слика 4.25., $F=6.321$, $df=6$).

У поређењу са контролом, хронична примена наночестица НА и АСР резултирала је значајним повећањем реактивности на термички стимулус ($p<0.01$), без значајне промене у групи третираној наночестицама ТСП. Међутим, симултана примена екстракта биљке FU и испитиваних калцијум фосфата спречила је било какву значајну промену времена до реакције у НР тесту, одржавајући вредности ВДР на нивоу контролних.



Слика 4.25. Промене параметра ВДР током *hot plate* теста код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСП – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСП+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, $*p<0.05$, $**p<0.01$.

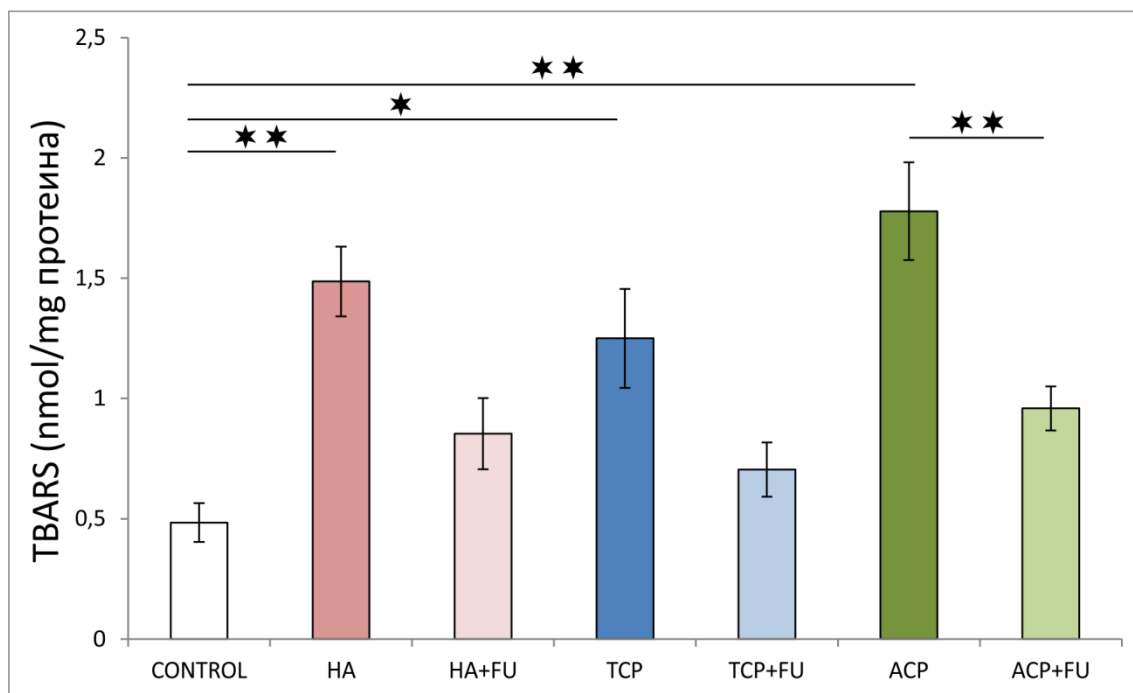
4.2. Промене маркера оксидативног стреса након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.

4.2.1. Маркери оксидативног стреса у ткиву хипокампуса

4.2.1.1. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене индекса липидне пероксидације у ткиву хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата

Резултати приказани на Слици 4.26. потврдили су снажно прооксидативно дејство примењених протокола, са значајним променама у индексу липидне пероксидације, израженим кроз вредности TBARS ($F=9.426$, $df=6$).

Самостални унос нано-калцијум фосфата узроковао је значајно повеће вредности TBARS у односу на контролу, што је било посебно изражено код примене наночестица HA и ACP ($p<0.01$) и нешто слабије при примени TCP ($p <0.05$). Ова потврда повећане производње ROS успешно је ублажена дуготрајном администрацијом екстракта биљке FU, без одступања у вредности TBARS за сва три примењена калцијум фосфата према контроли, и значајним смањењем вредности у ACP+FU у односу на ACP групу ($p<0.01$).

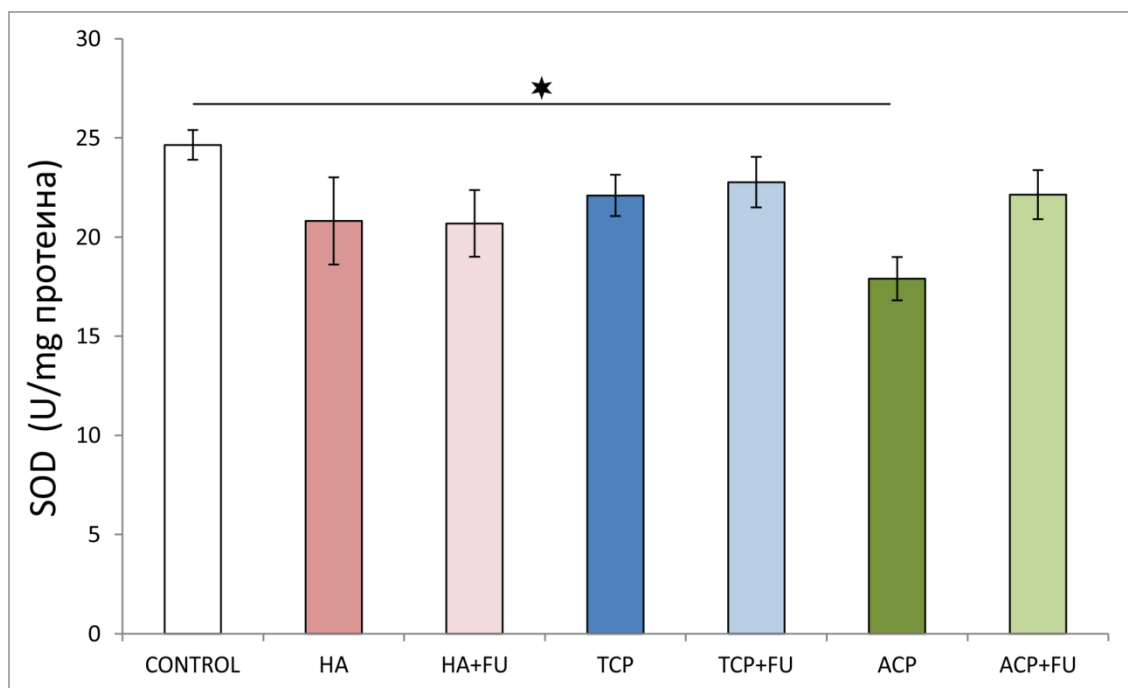


Слика 4.26. Промене индекса липидне пероксидације у ткиву хипокампуса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.2.1.2. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене активности супероксид дисмутазе у ткиву хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата

На слици 4.27. приказане су значајне промене у активности супероксид дисмутазе настале након спроведених протокола истраживања ($F=2.247$, $df=6$).

Активност антиоксидативног ензима супероксид дисмутазе након једномесечног уноса наночестица три различита калцијум фосфата није била уједначена. Тако је уочено значајно смањење активности SOD за групу третирану нано-ACP ($p<0.05$), док у групама третираним наночестицама HA и TCP није било промена. Антиоксидативна суплементација довела је до очувања вредности овог параметра оксидативног стреса блиским контролним, без значајних разлика међу третираним групама.

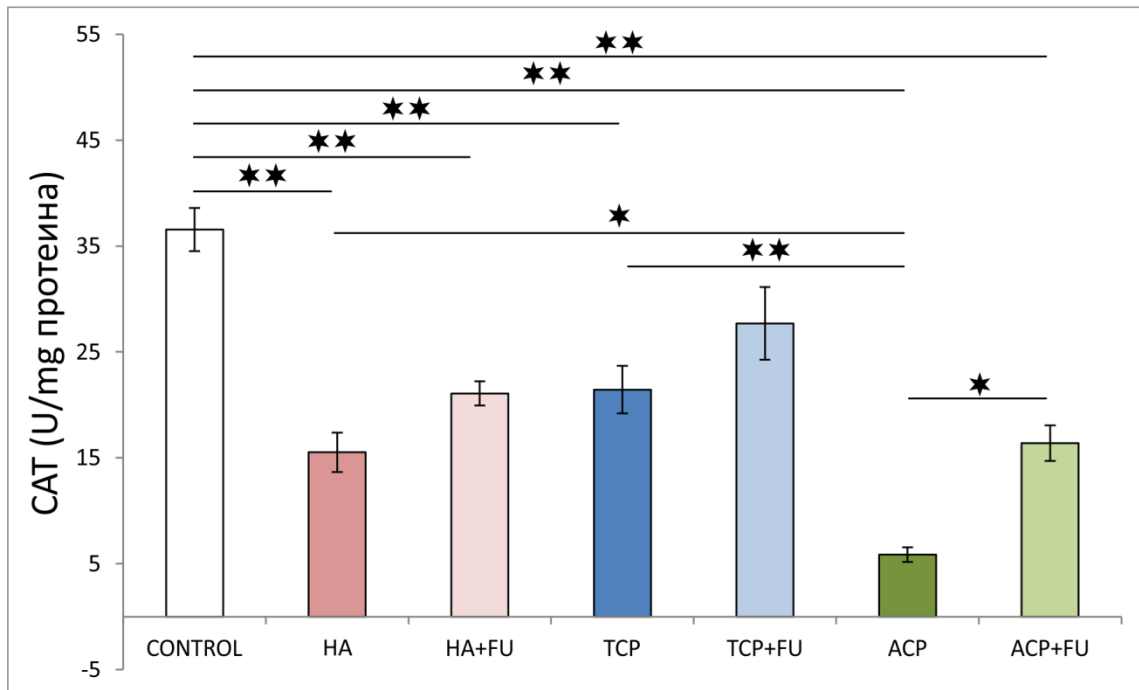


Слика 4.27. Промене активности супероксид дисмутазе у ткиву хипокампуса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.2.1.3. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене активности каталазе у ткиву хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата

Активност каталазе у хипокампусу пацова значајно је смањена примењеним протоколима истраживања ($F=22.818$, $df=6$).

Као што је приказано на Слици 4.28., прооксидативно дејство минералних честица нано-величине потврђено је значајним смањењем активности САТ након самосталне примене сва три једињења калцијум фосфата ($p<0.01$), док је смањење у АСР групи било значајно чак и у односу на НА групу ($p<0.01$). Осим у TCP+FU групи овај ефекат задржао се и након истовремене примене екстракта биљке FU са вредностима очуваним испод контролних ($p<0.01$). Иако је додатак антиоксиданаса третману АСР резултирао значајним порастом активност САТ ($p<0.05$), у АСР+FU комбинованој групи њена вредност остала је нижа од контролне ($p<0.01$).

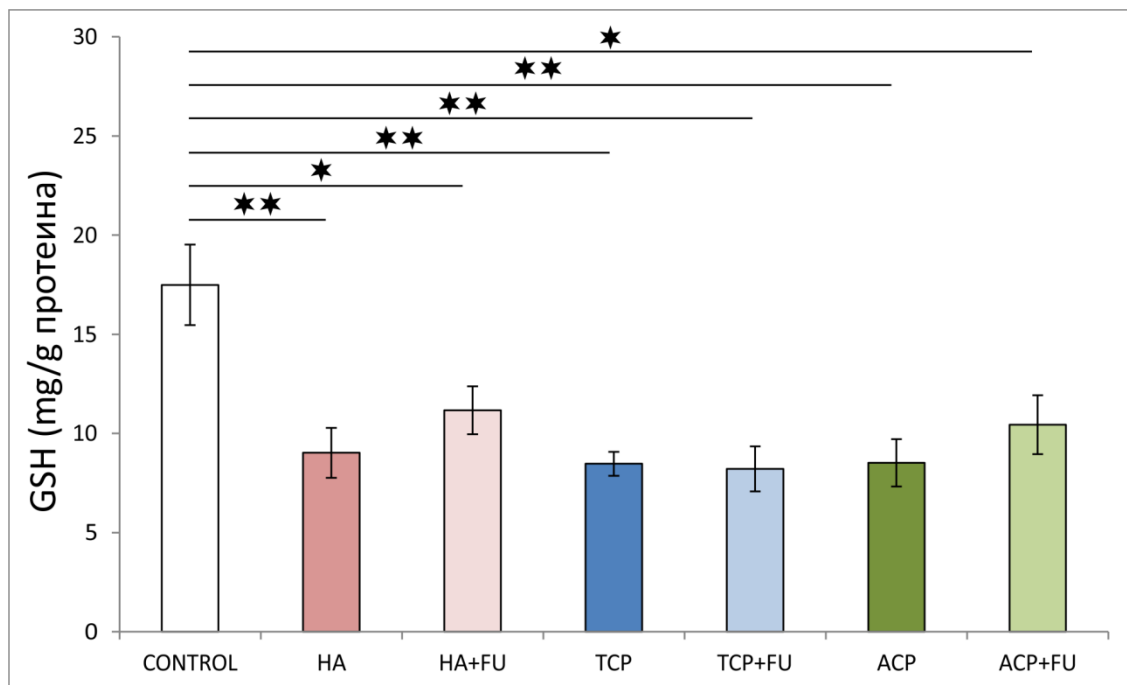


Слика 4.28. Промене активности каталазе у ткиву хипокампуса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.2.1.4. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене концентрације укупног глутатиона у ткиву хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата

Као што је приказано на Слици 4.29., примењени протоколи значајно су утицали на неензиматски антиоксидативни капацитет, изражен кроз вредности концентрације укупног глутатиона у ткиву хипокампуса пацова ($F=6.053$, $df=6$).

Нивои хипокампадног GSH значајно су смањени након појединачног, дуготрајног дејства сва три нано-калцијум фосфата у односу на контролне вредности ($p<0.01$). Овај ефекат примењених минералних једињења остао је и након антиоксидативне суплементације екстрактом биљке FU, али је био нешто дискретнији при симултаној примени антиоксиданса са наночестицама HA и ACP ($p<0.05$) у односу на примену са нано-TCP ($p<0.01$).



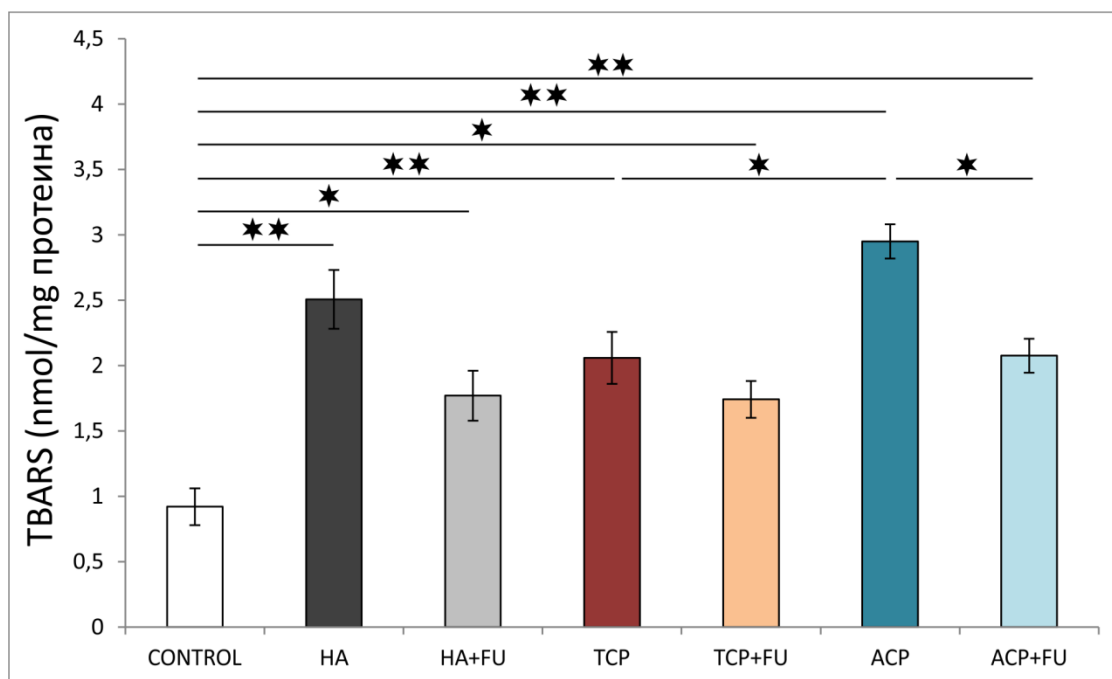
Слика 4.29. Промене концентрације укупног глутатиона у ткиву хипокампуса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.2.2. Маркери оксидативног стреса у ткиву префронталног кортекса

4.2.2.1. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене индекса липидне пероксидације у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата

Примена протокола истраживања значајано је променила вредности TBARS у префронталном кортексу пацова ($F=14.283$, $df=6$).

Као што је приказано и на Слици 4.30., поређено са контролом, третман животиња наночестицама НА, АСП и ТСП узроковао је значајно повећање индекса пероксидације липида ($p<0.01$). Такође, додатек екстракта биљке FU третману нано-калцијум фосфатима није имао ефекта у смањењу пероксидације липида, тако да су вредности TBARS остале значајно изнад контролних вредности ($p<0.05$ за нано-НА и нано-ТСП, $p<0.01$ за нано-АСП). Значајно мања вредност TBARS забележена је након заједничке примене антиоксиданса и АСП у односу на вредност након самосталне примене овог калцијум фосфата ($p<0.05$).

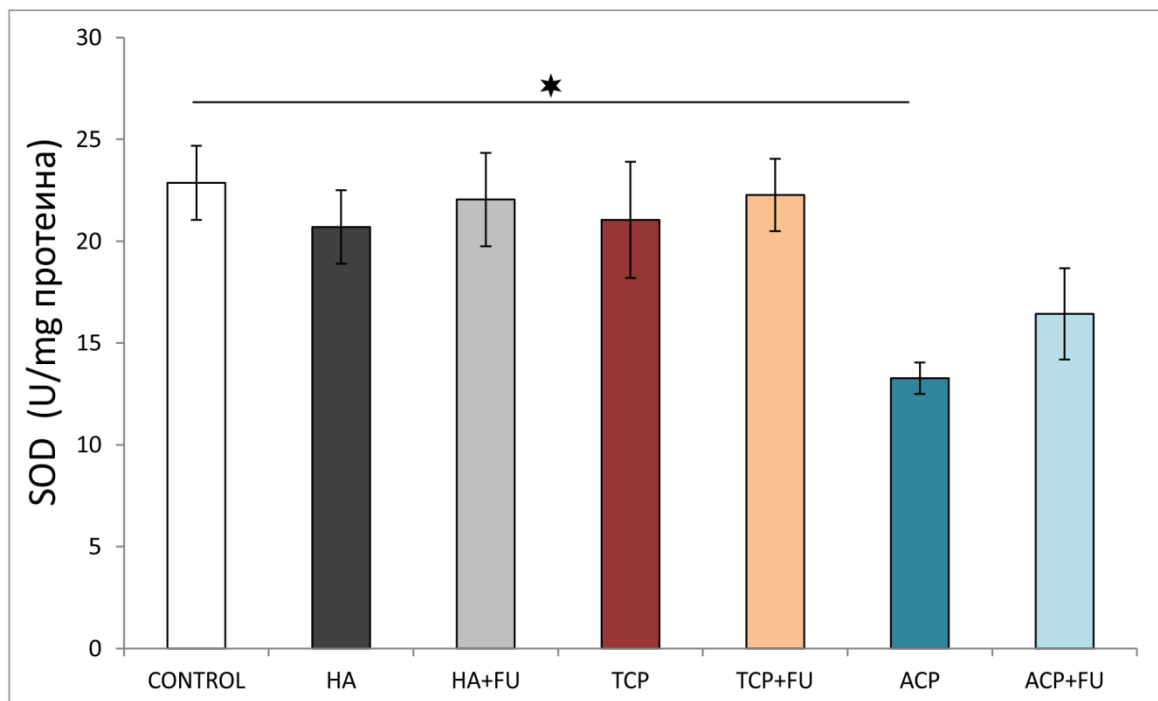


Слика 4.30. Промене индекса липидне пероксидације у ткиву префронталног кортекса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСП – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСП – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСП+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.2.2.2. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене активности супероксид дисмутазе у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата

На Слици 4.31. приказана је значајна промена у активности супероксид дисмутазе у ткиву префронталног кортекса након спроведених протокола студије ($F=3.115$, $df=6$).

Антиоксидативна активност SOD значајно је умањена након хроничног уноса нано-ACP ($p<0.05$), док други примењени нано-калцијум фосфати нису имали изражен ефекат. Истовремена администрација екстракта биљке FU са нано-калцијум фосфатима утицала је на очување активности овог ензима у префронталном кортексу пацова свих тертираних група, без значајнијих разлика у вредностима међу испитиваним групама.

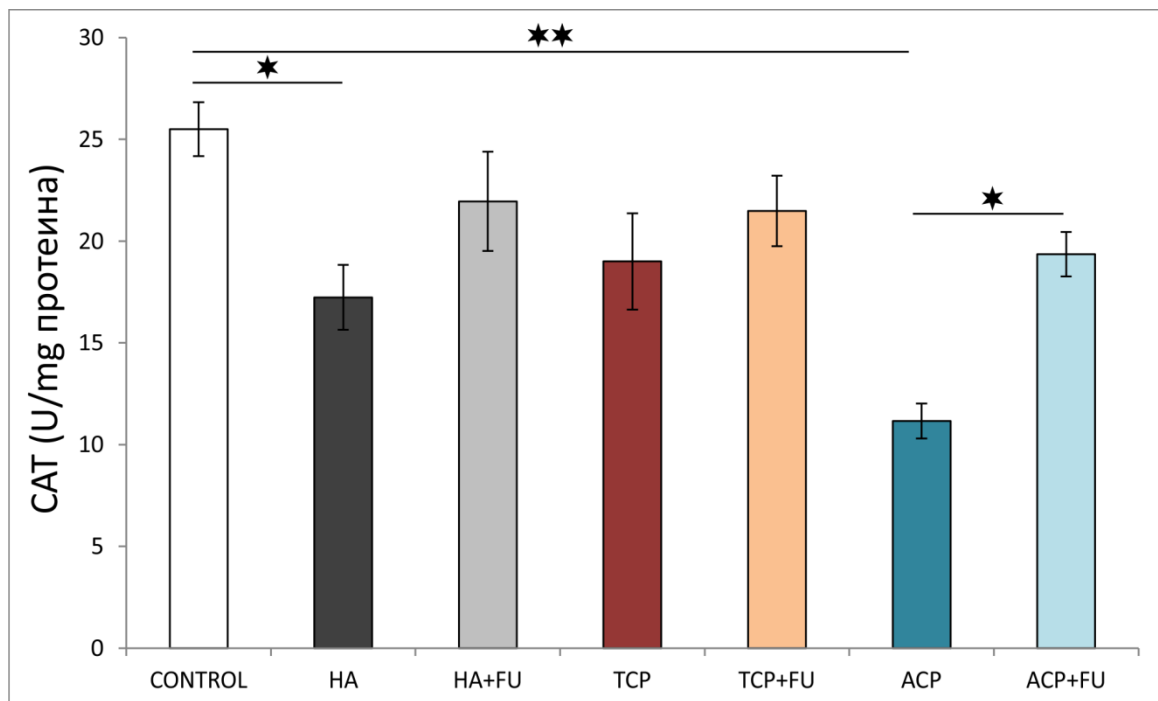


Слика 4.31. Промене активности супероксид дисмутазе у ткиву префронталног кортекса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.2.2.3. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене активности каталазе у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата

Значајно умањење активности каталазе у префронталном кортексу пацова, изазвано спроведеним протоколима студије, приказано је на Слици 4.32. ($F=6.777$, $df=6$).

Смањење активности САТ примећено је код животиња третираних наночестицама НА ($p<0.05$) као и АСР ($p<0.01$), док примена наночестица ТСП није имала утицаја. Антиоксидативни третман екстрактом биљке FU је поништио штетно дејство нано-калцијум фосфата и очувао активност каталазе као у контролној групи, са значајном разликом између животиња третираних самостално наночестицама АСР и наночестицама АСР са екстрактом биљке FU ($p<0.05$).

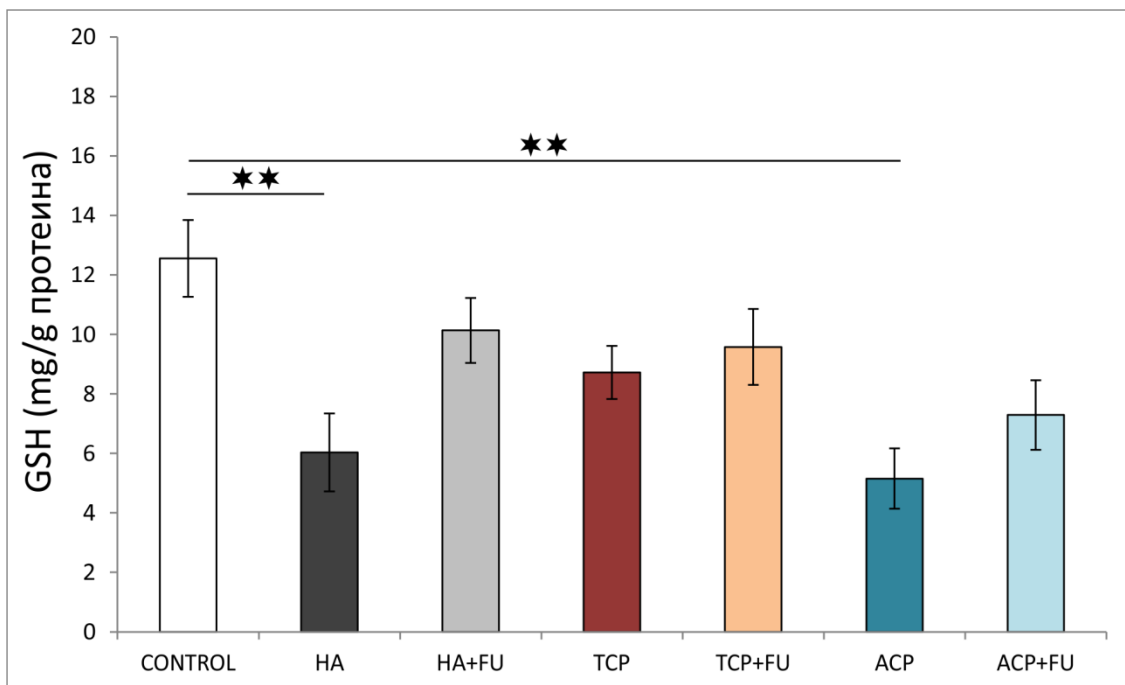


Слика 4.32. Промене активности каталазе у ткиву префронталног кортекса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.2.2.4. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене концентрације укупног глутатиона у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата

Дуготрајна примена протокола истраживања узроковала је значајно смањење концентрације укупног глутатиона у префронталном кортексу третираних пацова ($F=4.853$, $df=6$).

Као што је приказано на Слици 4.33., неензиматски антиоксидативни капацитет у префронталном кортексу, изражен кроз GSH, значајно је умањен уносом наночестица HA и ACP ($p<0.01$), док примена наночестица TCP није имала сличног ефекта. Истовремена примена екстракта биљке FU и наночестица сваког од три различита нано-калцијум фосфата одржала је концентрацију укупног глутатиона са вредностима блиским контролним.



Слика 4.33. Промене концентрације укупног глутатиона у ткиву префронталног кортекса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

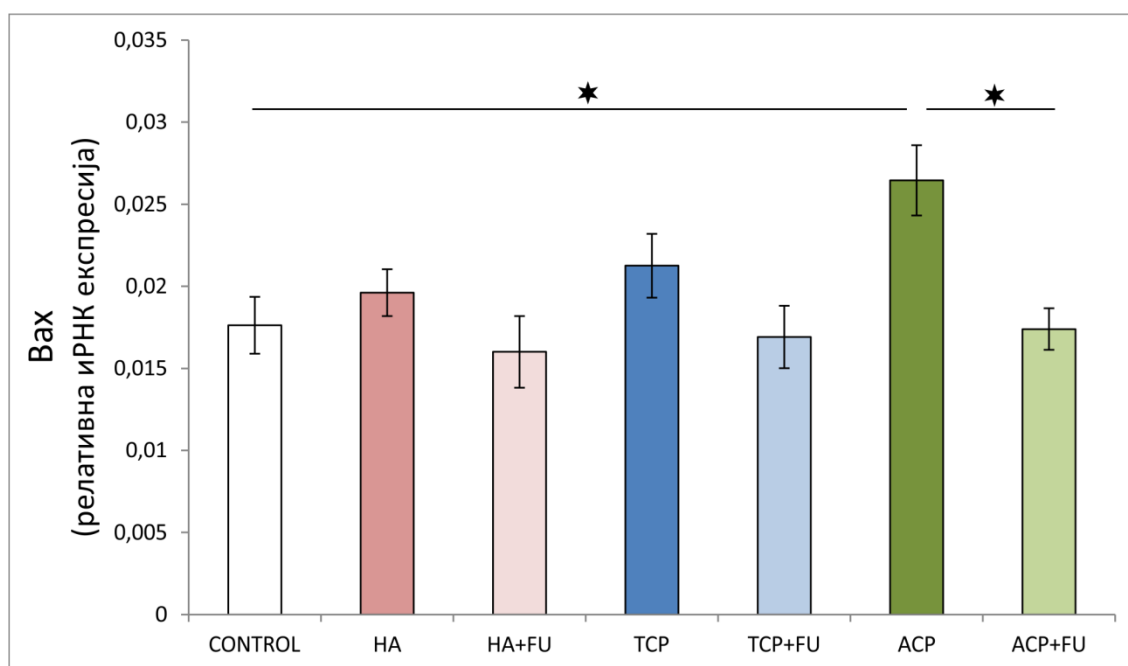
4.3. Промене маркера апоптотске активности након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.

4.3.1. Маркери апоптотске активности у ткиву хипокампуса

4.3.1.1. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене релативне генске експресије иРНК за Вах у ткиву хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата

Као што је приказано на Слици 4.34., релативна експресија гена проапоптотског Вах маркера у хипокампусу је значајно промењена након примене протокола студије ($F=3.896$, $df=6$).

У поређењу са контролним вредностима хронични третман наночестицама АСР узроковао је повећање релативне експресије гена за Вах у хипокампусу пацова ($p<0.05$), док остали примењени калцијум фосфати нису имали значајнији ефекат. Међутим, дејство антиоксидативне суплементације екстрактом биљке FU очувало је релативну експресију овог гена при примени сва три неорганска једињења, док је проапоптотски ефекат нано-АСР овим третманом успешно поништен ($p<0.05$).

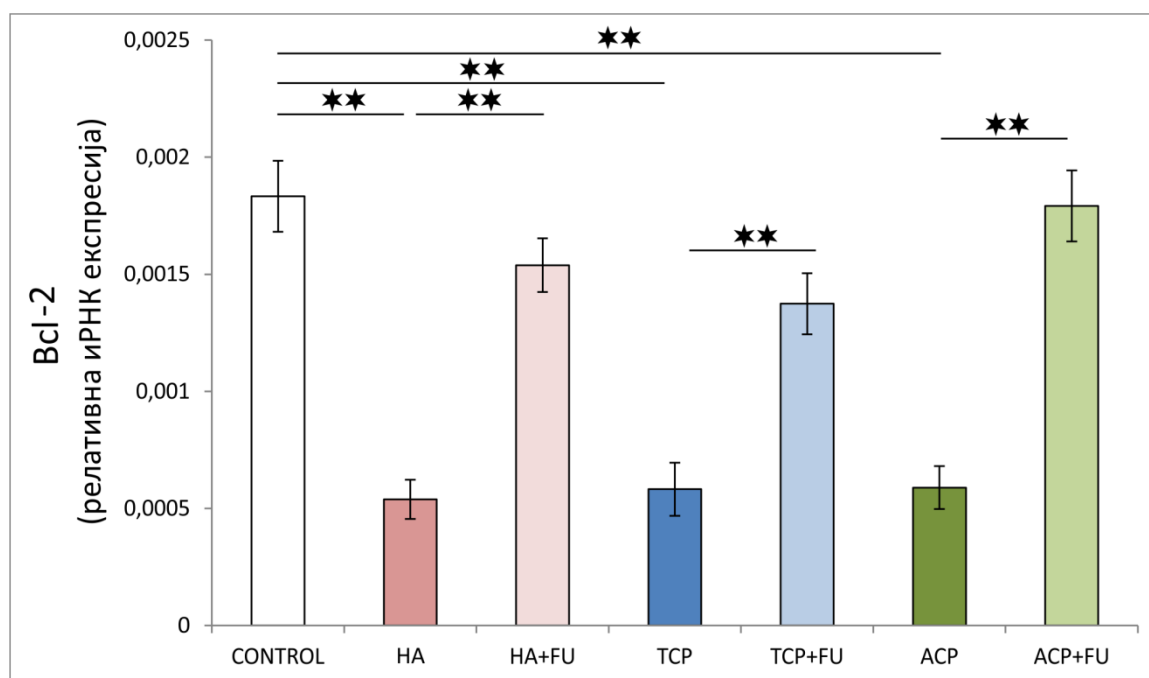


Слика 4.34. Промене релативне генске експресије иРНК за Вах у ткиву хипокампуса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.3.1.2. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 у ткиву хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата

Релативна генска експресије иРНК за Bcl-2 у ткиву хипокампуса значајно је промењена примењеним протоколима студије ($F=23.364$, $df=6$).

Као што је приказано на Слици 4.35., утицај појединачно примењених калцијум фосфата нано-величине на антиапоптотски капацитет ткива хипокампуса пацова био је нарочито изражен, где су сва три примењена минерална једињена значајно смањила релативну експресију Bcl-2 у односу на контролу ($p<0.01$). Ово смањење експресије гена Bcl-2 снажно је компензовано хроничним, истовременим уносом екстракта биљке FU у све три групе, враћајући релативну експресију гена за Bcl-2 на ниво контролних вредности. Штавише, уочена је значајна промена у вредности овог параметра апоптозе између самосталног третмана и третмана удруженог са применом екстракта биљке FU за сваки нано-калцијум фосфат ($p<0.01$).

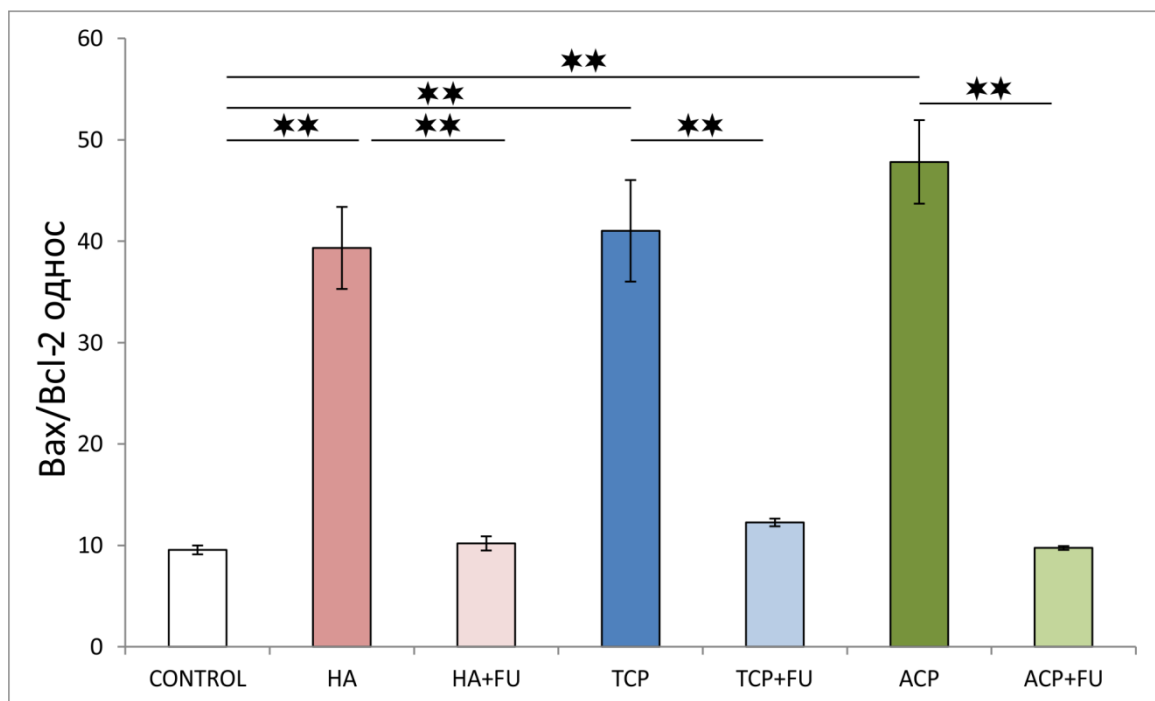


Слика 4.35. Промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 у ткиву хипокампуса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.3.1.3. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата

Односи експресије гена за Вах и Bcl-2 маркере апоптозе у ткиву хипокампуса потврдиле су значајан утицај примењених протокола истраживања ($F=35.992$, $df=6$).

Као што је приказано на Слици 4.36., вредност односа релативне експресије гена Вах/Bcl-2 у групама које су примале самостално наночестице НА, АСР и ТСР биле су значајно изнад контролних ($p<0.01$), док је антиоксидативна суплементација успела да одржи вредности овог односа у свим комбинованим групама на нивоу контроле. Такође, однос експресије гена Вах/Bcl-2 у свим групама које су примале екстракт биљке FU био је значајно нижи него у групама које су третиране самостално наночестицама калцијум фосфата ($p<0.01$).



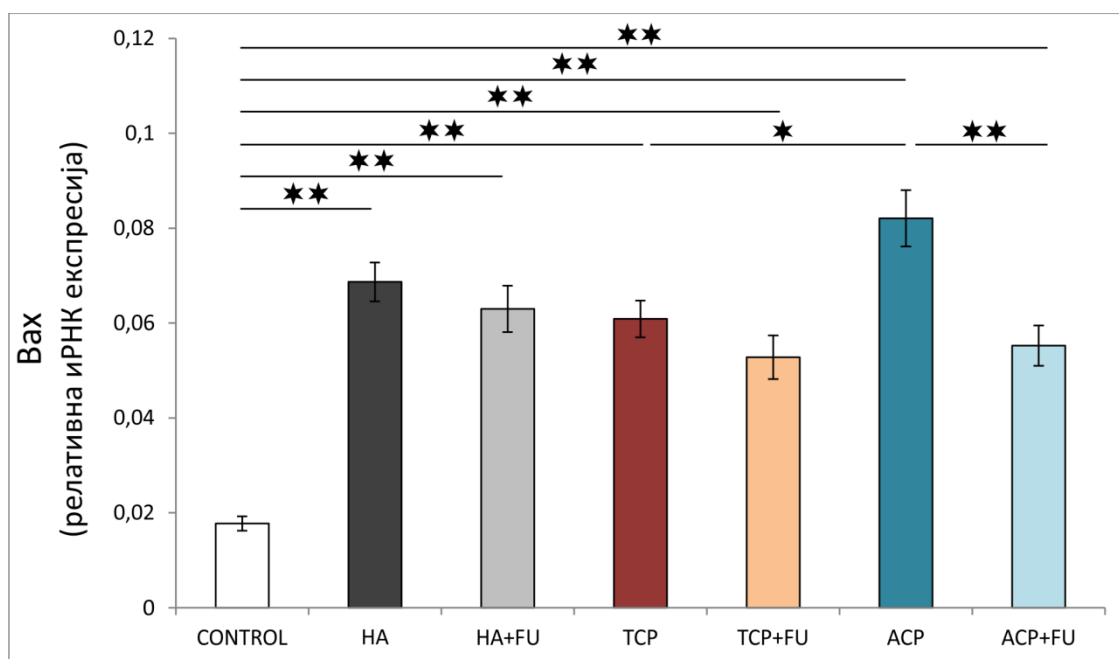
Слика 4.36. Промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСР – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСР+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.3.2. Маркери апоптотске активности у ткиву префронталног кортекса

4.3.2.1. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене релативне генске експресије иРНК за Вах у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата

Као што је приказано на Слици 4.37., примењени протоколи изазвали су значајне промене релативне генске експресије иРНК за Вах у префронталном кортексу пацова ($F=20.963$, $df=6$).

Релативна генска експресија иРНК за Вах значајно је побољшана са сва три примењена нано-калцијум фосфата ($p<0.01$). Међутим, највећи проапоптотски ефекат примењен је у АСР групи, у којој је вредност овог параметра апоптозе била знатно изнад вредности забележених у ТСП групи ($p<0.05$). Са друге стране, додатак екстракта биљке FU није успео да спречи проапоптотско деловање примењених калцијум фосфата, задржавајући вредности експресије гена за Вах значајно изнад контролних ($p<0.01$). Антиоксидативна суплементација је једино у АСР+FU комбинованој групи показала протективно дејство значајно умањујући експресију гена за Вах у односу на вредности при самосталној примени наночестица АСР ($p<0.01$).

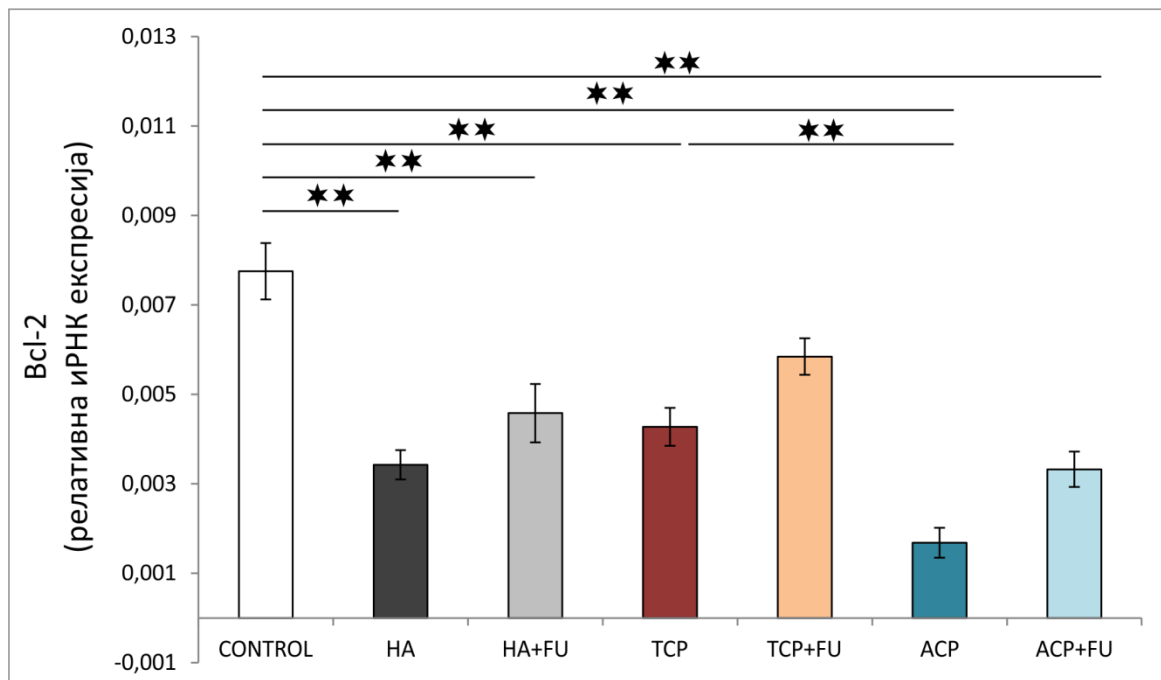


Слика 4.37. Промене релативне генске експресије иРНК за Вах у ткиву префронталног кортекса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.3.2.2. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата

Вредности релативне генске експресије за Bcl-2 антиапоптотски маркер у префронталном кортексу пацова значајно су промењене протоколима ове студије ($F=17.234$, $df=6$).

Као што приказује Слика 4.38., примењени калцијум фосфати значајно су смањила релативну експресију Bcl-2 гена у односу на контролне вредности ($p<0.01$), са најснажнијим ефектом наночестица АСП, где је умањење било значајно чак и у поређењу са ефектом наночестица ТСП ($p<0.01$). Антиоксидативно дејство екстракта биљке FU није било довољно да спречи ефекат примењених калцијум фосфата на релативну експресију гена за Bcl-2, изузев у ТСП групи у којој су вредности овог параметра очуване на нивоу контролних.

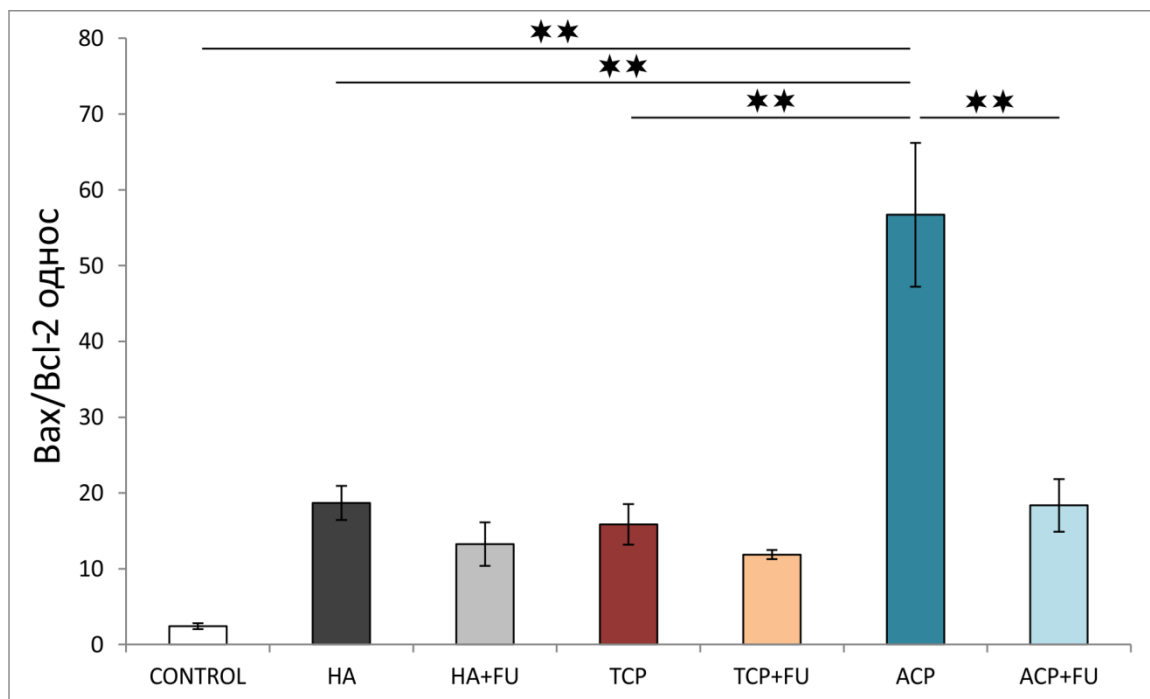


Слика 4.38. Промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 у ткиву префронталног кортекса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСП – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСП+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.3.2.3. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата

Примењени протоколи истраживања, као што је приказано на Слици 4.39. значајно су утицали на однос релативне експресије гена за Вах и Bcl-2 маркере апоптозе у ткиву префронталног кортекса ($F=16.939$, $df=6$).

Проапоптотски утицај калцијум фосфата у овој студији био је значајно изражен при примени АСР, како према контролним тако и према вредностима добијеним у НА и ТСР групи ($p<0.01$). Антиоксидативни третман, очувао је вредности односа реативне генске експресије за Вах и Bcl-2 у свим комбинованим групама на нивоу котролних, док је у АСР+FU групи вредност овог односа била значајно мања него у АСР групи ($p<0.01$).



Слика 4.39. Промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву префронталног кортекса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, НА – група са хидроксиапатитом, ТСР – група са трикалцијум фосфат хидратом, АСР – група са аморфним калцијум фосфатом, НА+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, ТСР+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, АСР+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

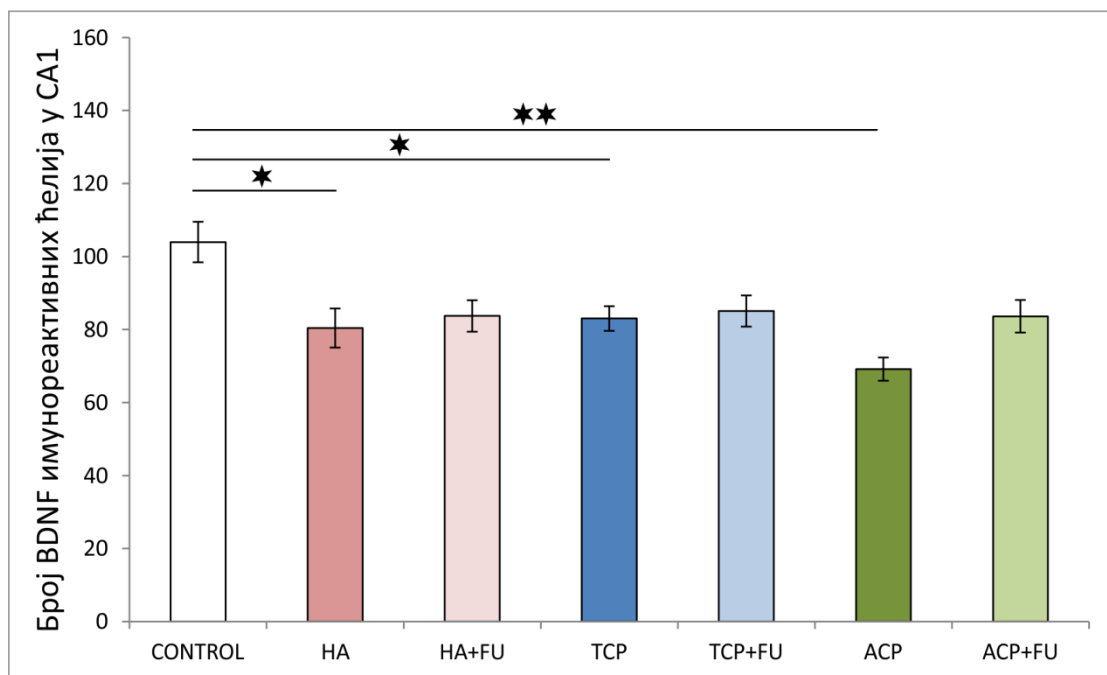
4.4. Промена броја BDNF имунореактивних ћелија и релативне генске експресије иРНК за BDNF након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.

4.4.1. Број BDNF имунореактивних ћелија у ткиву хипокампуса

4.4.1.1. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене броја BDNF имунореактивних ћелија у CA1 региону хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата

Број BDNF имунореактивних ћелија у CA1 региону хипокампуса значајно је промењен примењеним протоколима студије ($F=5.396$, $df=6$).

Како је приказано на Слици 4.40., сва три једињења калцијум фосфата умањила су број BDNF имунореактивних ћелија у CA1 региону хипокампуса у односу на контролу, при чему је значајнији ефекат постигнут применом наночестица ACP ($p<0.01$) него третманом нано-НА и TCP ($p<0.05$). Антиоксидативна суплементација очувала је вредности овог параметра на контролном нивоу у свим групама које су третиране истовремено нано-калцијум фосфатима и екстрактом биљке FU.

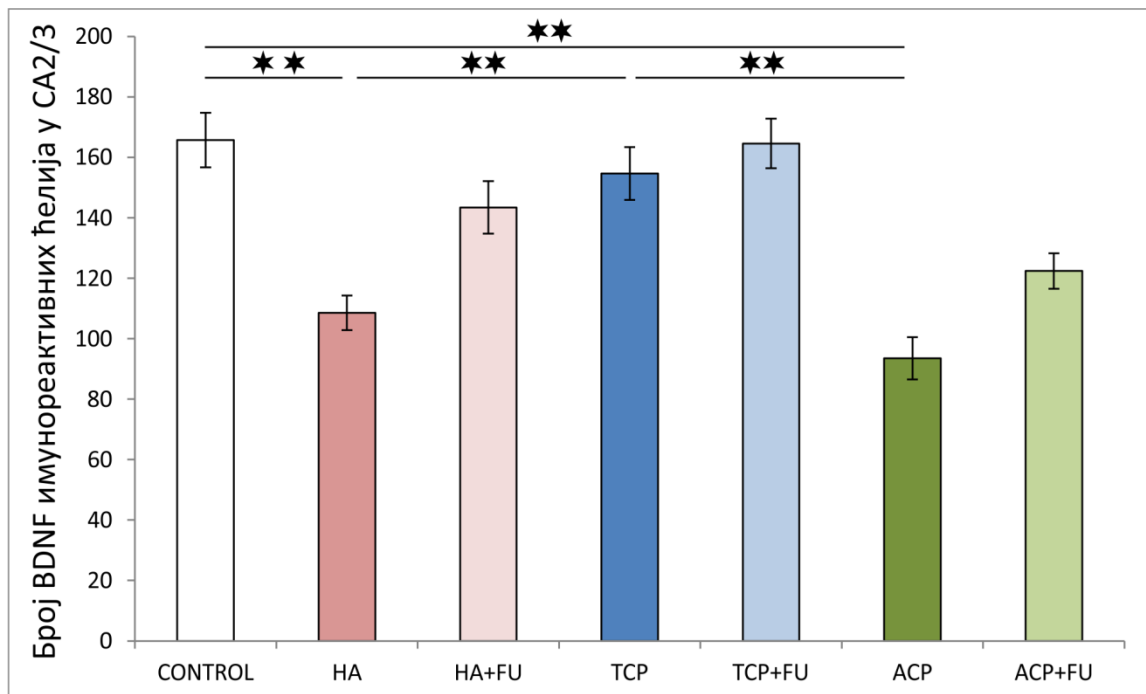


Слика 4.40. Промене броја BDNF имунореактивних ћелија у CA1 региону хипокампуса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.4.1.2. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене броја BDNF имунореактивних ћелија у CA2/3 региону хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата

Примењени протоколи студије значајно су променили број BDNF имунореактивних ћелија у CA2/3 региону хипокампуса ($F=13.575$, $df=6$).

Као што је приказано на Слици 4.41., администрација наночестица HA и ACP током студије је узроковала значајано смањење имунореактивности ћелија за BDNF у поређењу са контролом ($p<0.01$). Примена TCP наночестица није имала утицаја на број BDNF имунореактивних ћелија CA2/3 региона хипокампуса, док је њихов број био значајно већи него при примени наночестица HA и ACP ($p<0.01$). Заштитна улога екстракта биљке FU потврђена је спречавањем значајног смањења броја BDNF имунореактивних ћелија у HA+FU и ACP+FU групама у поређењу са контролним вредностима.

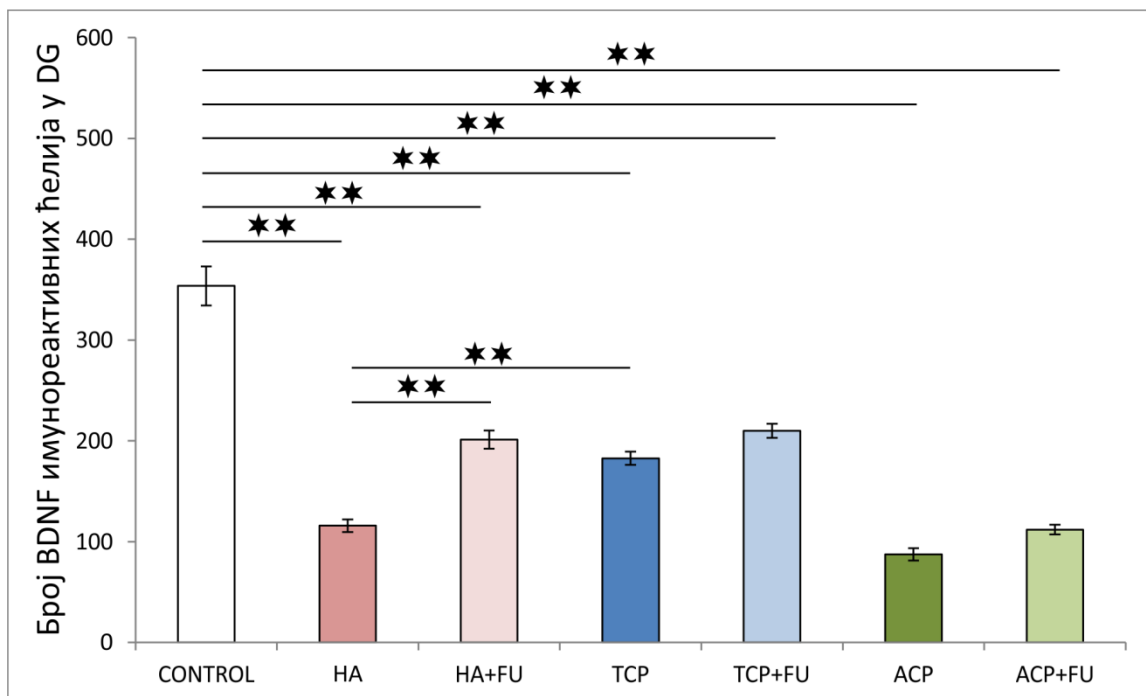


Слика 4.41. Промене броја BDNF имунореактивних ћелија у CA2/3 региону хипокампуса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.4.1.3. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене броја BDNF имунореактивних ћелија у DG региону хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата

Слика 4.42. приказује да су примењени протоколи студије значано променили број BDNF имунореактивних ћелија у DG региону хипокампуса ($F=88.388$, $df=6$).

Самостална примена наночестица калцијум фосфата значајно је смањила број BDNF имунореактивних ћелија у односу на контролу ($p<0.01$). Међутим, смањење постигнуто у HA групи такође је било значајно и у поређењу са TCP групом ($p<0.01$). Иако је при симултаног примени наночестица HA и екстракта биљке FU BDNF имунореактивност у DG региону била значајно повећана у односу на вредности при самосталној примени нано-HA ($p<0.01$), број BDNF имунореактивних ћелија у свим комбинованим групама је и даље остао значајно мањи од контролне вредности ($p<0.01$).

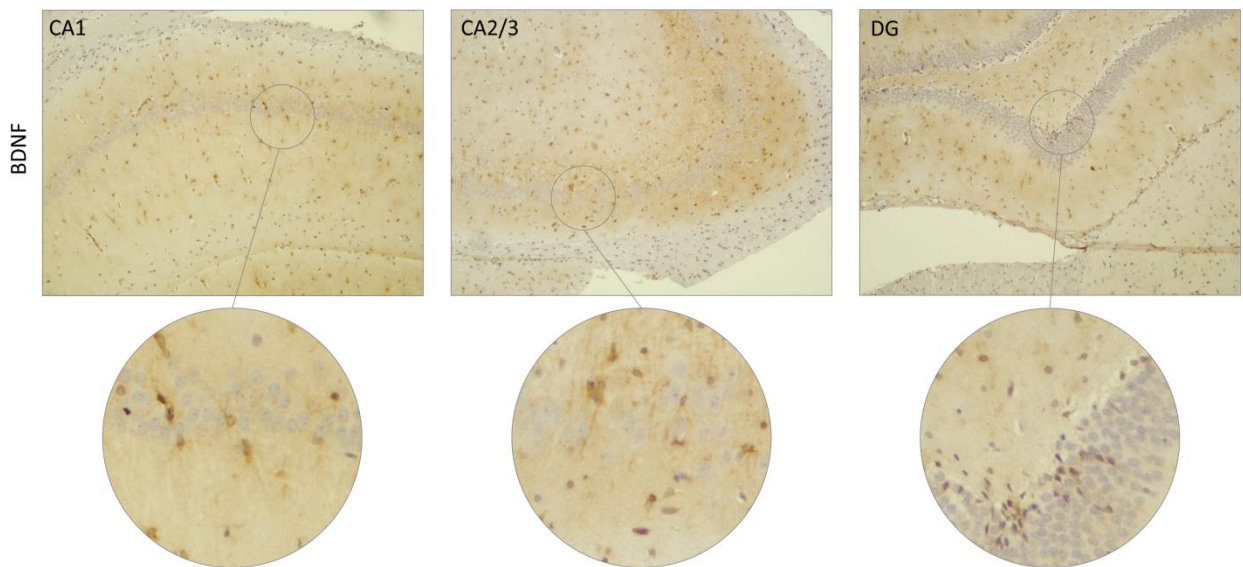


Слика 4.42. Промене броја BDNF имунореактивних ћелија у DG региону хипокампуса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

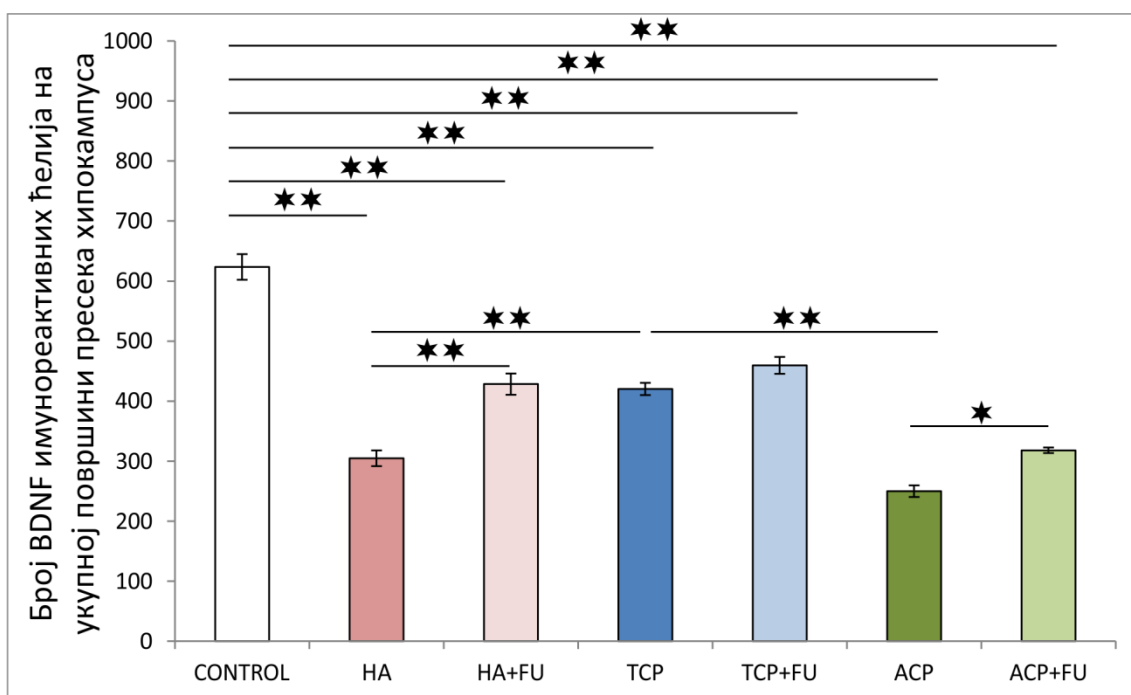
4.4.1.4. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене броја BDNF имунореактивних ћелија на укупној површини пресека хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата

Примењени протоколи студије значајно су утицали на број BDNF имунореактивних ћелија хипокампуса ($F=79.621$, $df=6$), са карактеристичном дистрибуцијом имунореактивних ћелија приказаном на Слици 4.43..

Као што је приказано на Слици 4.44., примењени калцијум фосфати значајно су умањили укупан број BDNF имунореактивних ћелија у хипокампусу ($p<0.01$). Такође, BDNF имунореактивност је у HA и ACP групи била значајно нижа чак и у поређењу са TCP групом ($p<0.01$). Примењено смањење након дуготрајног уноса наночестица HA, TCP и ACP није поништено ни истовременом применом екстракта биљке FU, остајући на нивоима испод контролних вредности ($p<0.01$). И поред тога антиоксидативна суплементација је значајно повећала број BDNF имунореактивних ћелија у HA+FU и ACP+FU групама у поређењу са групама где су HA ($p<0.01$) и ACP ($p<0.05$) примењени самостално.



Слика 4.43. Репрезентативне слике експресије BDNF (имунохистохемијско бојење) на пресецима хипокампуса пацова.



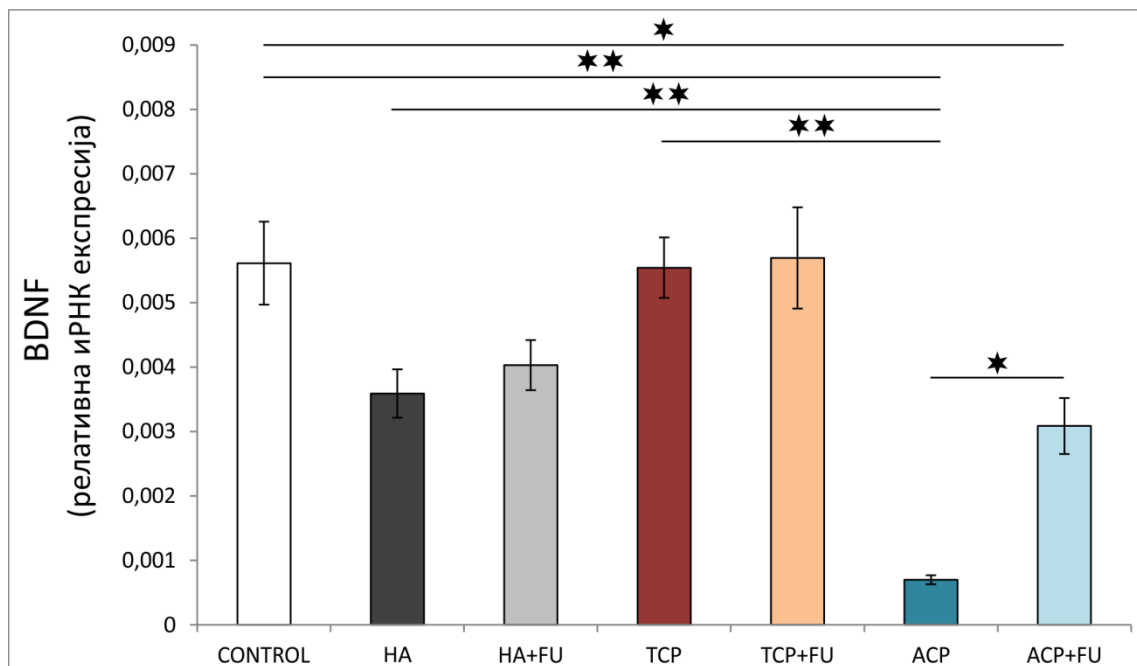
Слика 4.44. Промене броја BDNF имунореактивних ћелија на укупној површини пресека хипокампуса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; n=7 по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара ± стандардна грешка, *p<0.05, **p<0.01.

4.4.2. Релативна генска експресија иРНК за BDNF и број BDNF имунореактивних ћелија у ткиву префронталног кортекса

4.4.2.1. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене релативне генске експресије иРНК за BDNF у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата

Експресија BDNF у префронталном кортексу, процењена помоћу релативне експресије иРНК, као што је приказано на Слици 4.45, значајно је измењена примењеним протоколима. ($F=14.471$, $df=6$).

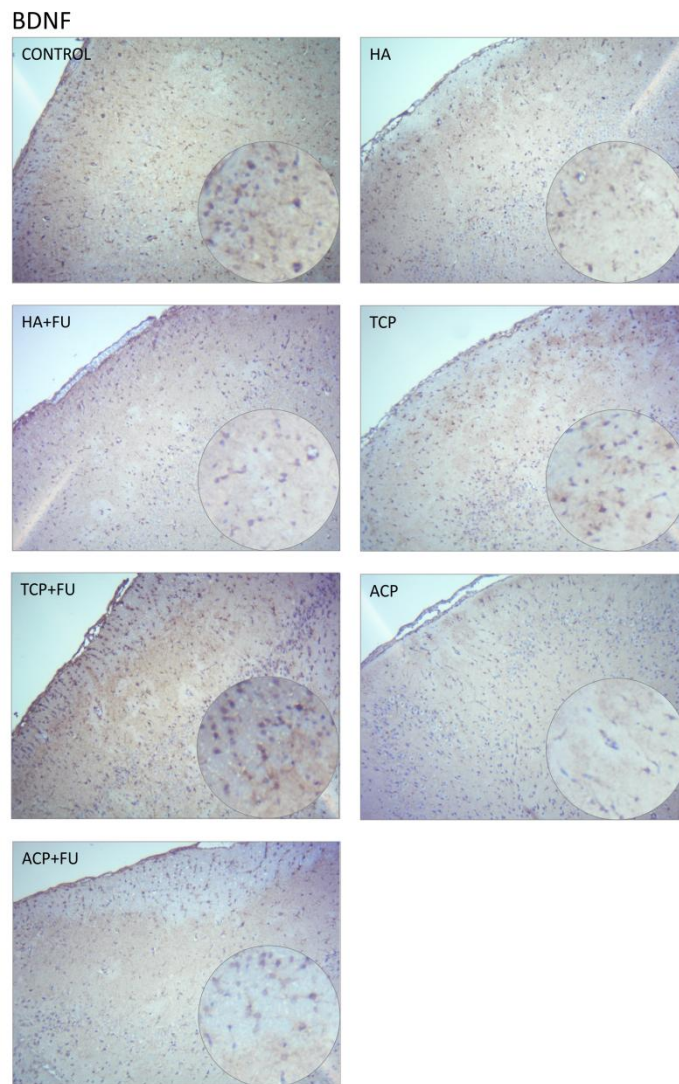
Експресија гена за BDNF након апликације нано-калцијум фосфата манифестована је значајним смањењем вредности постигнутим само у ACP групи ($p<0.01$), док примена наночестица друга два минерална једињења није изазвала значајне промене у односу на контролу. Такође, забележени ниво експресије за BDNF иРНК у ACP групи био је значајно мањи од нивоа у HA и TCP групи ($p<0.01$). Иако је примена екстракта биљке FU резултирала очувањем вредности за релативну генску експресију иРНК за BDNF у HA+FU и TCP+FU комбинованим групама, значајно повећање забележено је само код удружене примене нано-ACP са екстрактом биљке FU у односу на самосталну примену овог калцијум фосфата ($p<0.05$), али и даље са вредностима значајно испод контролних ($p<0.05$).



Слика 4.45. Промене релативне генске експресије иРНК за BDNF у ткиву префронталног кортекса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Експресја имунореактивних ћелија за BDNF у префронталном кортексу, представљена на Слици 4.46., потврђује различит степен ефеката спроведених протокола.

Уочава се да је у поређењу са контролном групом дошло до смањења броја имунореактивних ћелија након третмана наночестицама калцијум фосфата, при чему је овај ефекат био најочљивији у АСР групи. Такође, приметно је и да је симултана примена екстракта биљке FU смањивала негативан утицај калцијум фосфата на број имунореактивних ћелија у префронталном кортексу.



Слика 4.46. Репрезентативне слике експресије BDNF (имунохистохемијско бојење) на пресецима префронталног кортекса пацова.

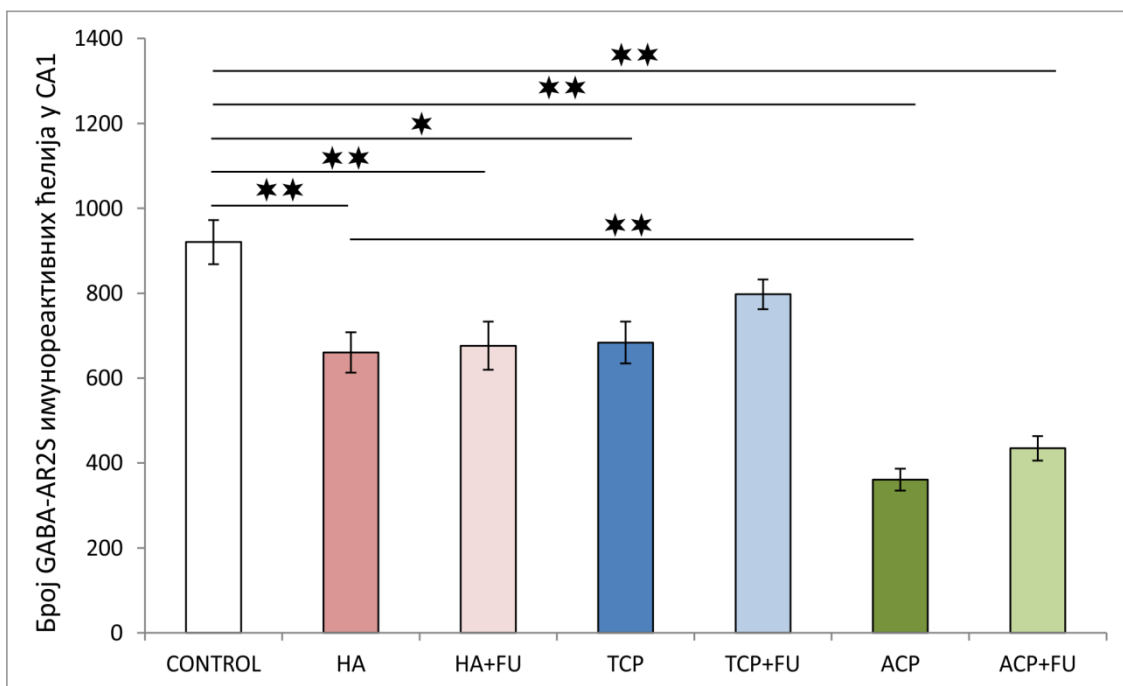
4.5. Промена броја GABA A имунореактивних ћелија и релативне генске експресије иРНК за GABA A након третмана наночестицама калцијум фосфата, примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.

4.5.1. Број GABA A имунореактивних ћелија у ткиву хипокампуса

4.5.1.1. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене броја GABA-AR2S имунореактивних ћелија у CA1 региону хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата

На Слици 4.47. приказане су значајне промене у GABA-AR2S имунореактивности ћелија CA1 региона хипокампуса изазване спроведеним протоколима студије ($F=19.839$, $df=6$).

Самостална примена све три врсте нано-калцијум фосфата довела је до значајног смањења броја GABA-AR2S имунореактивних ћелија у односу на контролу, при чему је израженији ефекат потврђен у HA и ACP ($p<0.01$) него у TCP групи ($p<0.05$). Такође, значајно мања GABA-AR2S имунореактивност је забележена код животиња третираних наночестицама ACP у односу на третиране нано-HA ($p<0.01$). Примена екстрактом биљке FU незнатно је ублажила дејство примењених калцијум фосфата са вредностима за HA+FU и ACP+FU групу које су остале значајно испод контролних ($p<0.01$), и без значајне разлике у односу на вредности у TCP+FU групи.

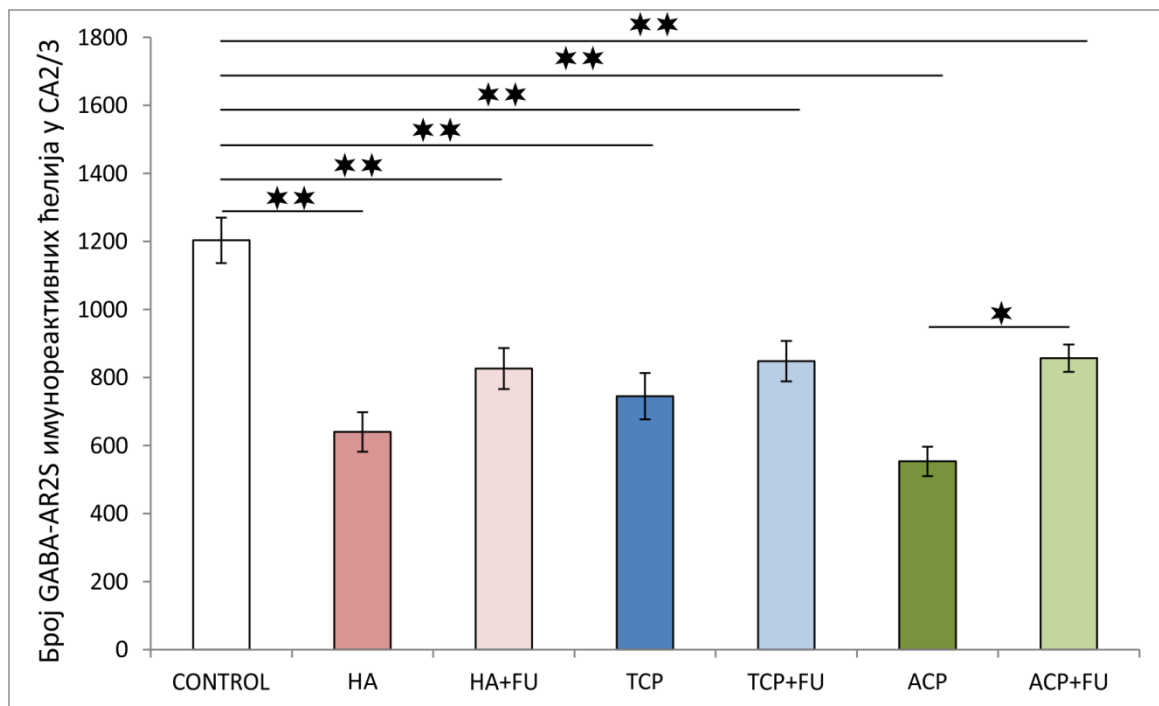


Слика 4.47. Промене броја GABA-AR2S имунореактивних ћелија у СА1 региону хипокампуса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; n=7 по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара ± стандардна грешка, *p<0.05, **p<0.01.

4.5.1.2. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене броја GABA-AR2S имунореактивних ћелија у СА2/3 региону хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата

Примењени протоколи студије довели су до значајних промена у GABA-AR2S имунореактивности ћелија СА2/3 региона хипокампуса ($F=13.006$, $df=6$).

Као што је приказано на Слици 4.48., тридесетодневна, орална примена нано-калцијум фосфата, значајно је смањила GABA-AR2S имунореактивност ћелија СА2/3 региона у односу на контролне вредности ($p<0.01$). До истог ефекта дошло је и након комбинованог третмана нано-калцијум фосфатима и екстрактом биљке FU ($p<0.01$), док је у ACP+FU групи број GABA-AR2S имунореактивних ћелија био значајно виши него у ACP групи ($p<0.05$), али и даље мањи од контролних вредности.

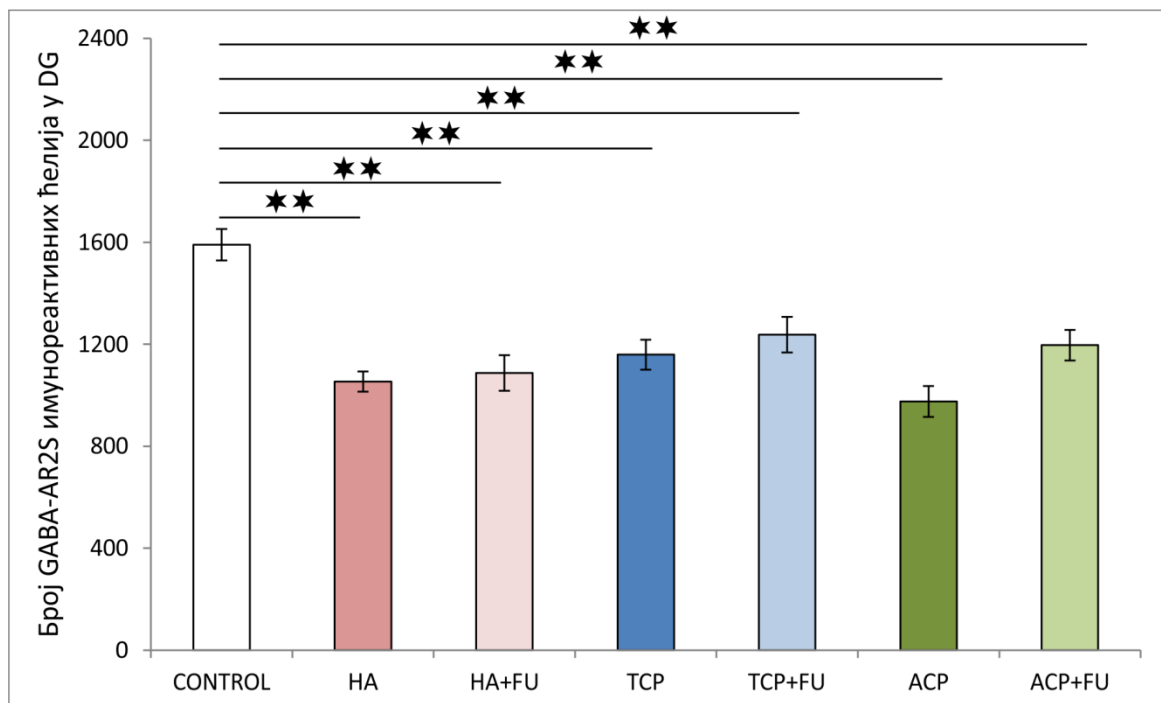


Слика 4.48. Промене броја GABA-AR2S имунореактивних ћелија у СА2/3 региону хипокампуса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.5.1.3. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене броја GABA-AR2S имунореактивних ћелија у DG региону хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата

Слика 4.49. приказује значајне промене у GABA-AR2S имунореактивности ћелија у DG региону хипокампуса након спроведених протокола студије ($F=10.745$, $df=6$).

Примена нано-калцијум фосфата самостално и у комбинацији са екстрактом биљке FU довела је до значајног смањења броја GABA-AR2S имунореактивних ћелија овог региона хипокампуса ($p<0.01$). Резултати добијени у комбинованим групама, потврдили су да примењена антиоксидативна суплементација није могла да поништи смањење GABA-AR2S имунореактивности у хипокампусу, пошто се број GABA-AR2S имунореактивних ћелија задржао испод контролних вредности.

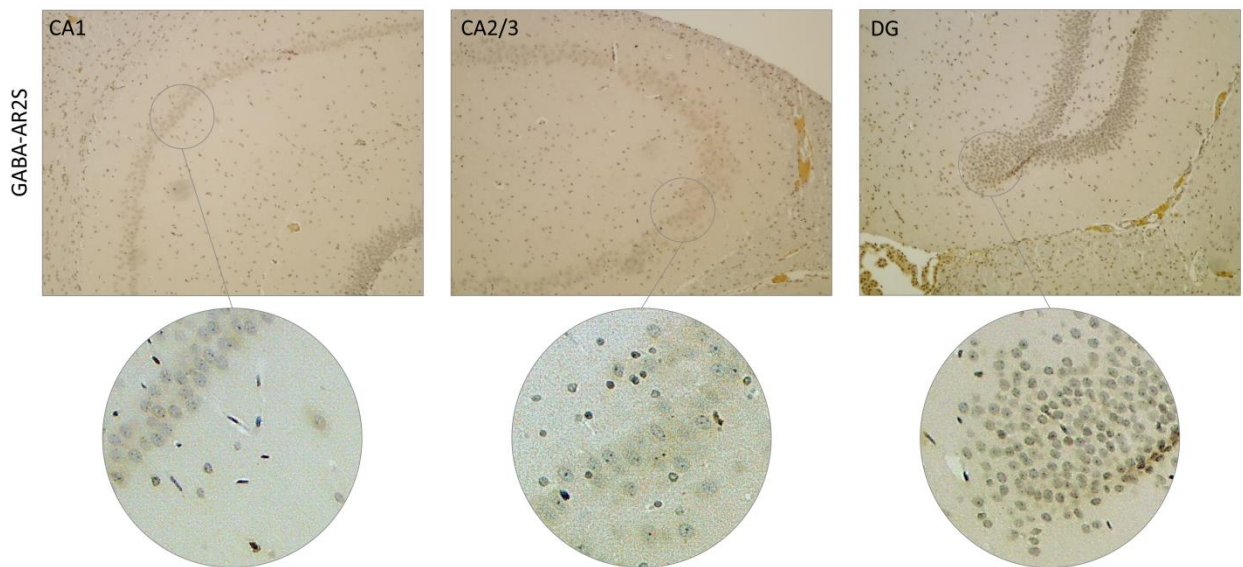


Слика 4.49. Промене броја GABA-AR2S имунореактивних ћелија у DG региону хипокампуса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

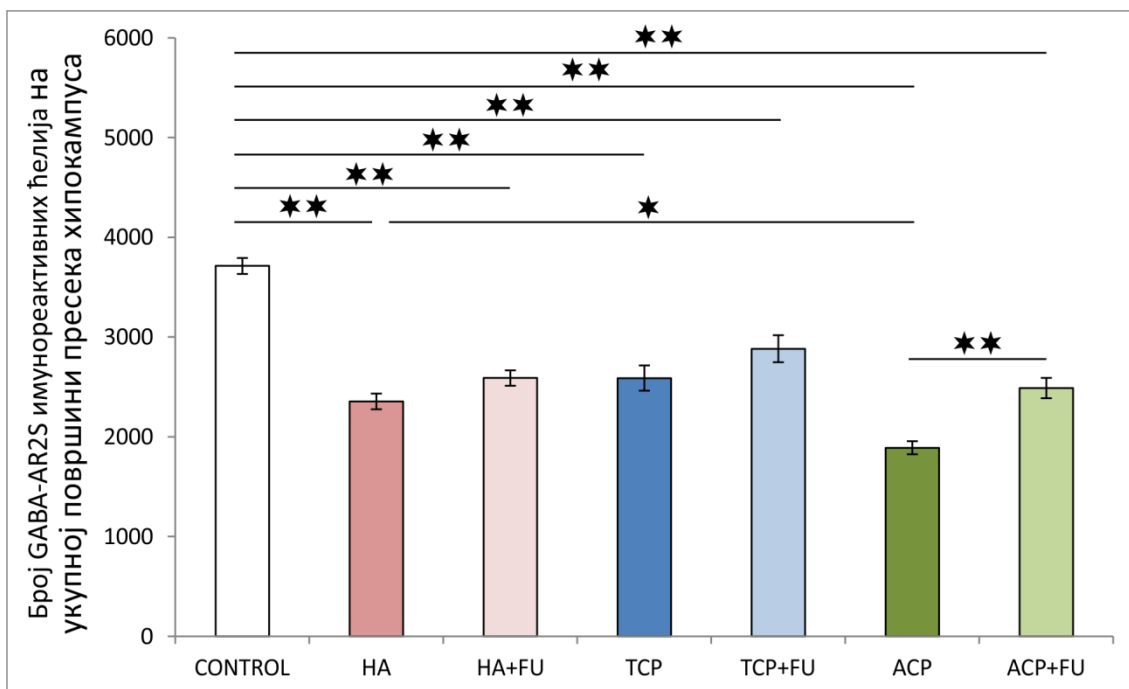
4.5.1.4. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене броја GABA-AR2S имунореактивних ћелија на површини укупног пресека хипокампуса изазване наночестицама калцијум фосфата

Примењени протоколи студије значајно су утицали на број GABA-AR2S имунореактивних ћелија хипокампуса ($F=32.343$, $df=6$), праћену дистрибуцијом имунореактивних ћелија приказаном на Слици 4.50..

Према резултатима истраживања, приказаним на Слици 4.51., укупан број GABA-AR2S имунореактивних ћелија хипокампуса био је значајно смањен у свим третираним групама у односу на контролу ($p<0.01$), док је овај параметар у АСР групи био значајно мањи и у односу на НА групу ($p<0.05$). Антиоксидативна суплементација екстрактом биљке FU ублжила је ефекте дејства само нано-АСР ($p<0.01$), иако је број GABA-AR2S имунореактивних ћелија у АСР+FU групи остао испод нивоа контролних вредности.



Слика 4.50. Репрезентативне слике експресије GABA-AR2S (имунохистохемијско бојење) на пресецима хипокампуса пацова.



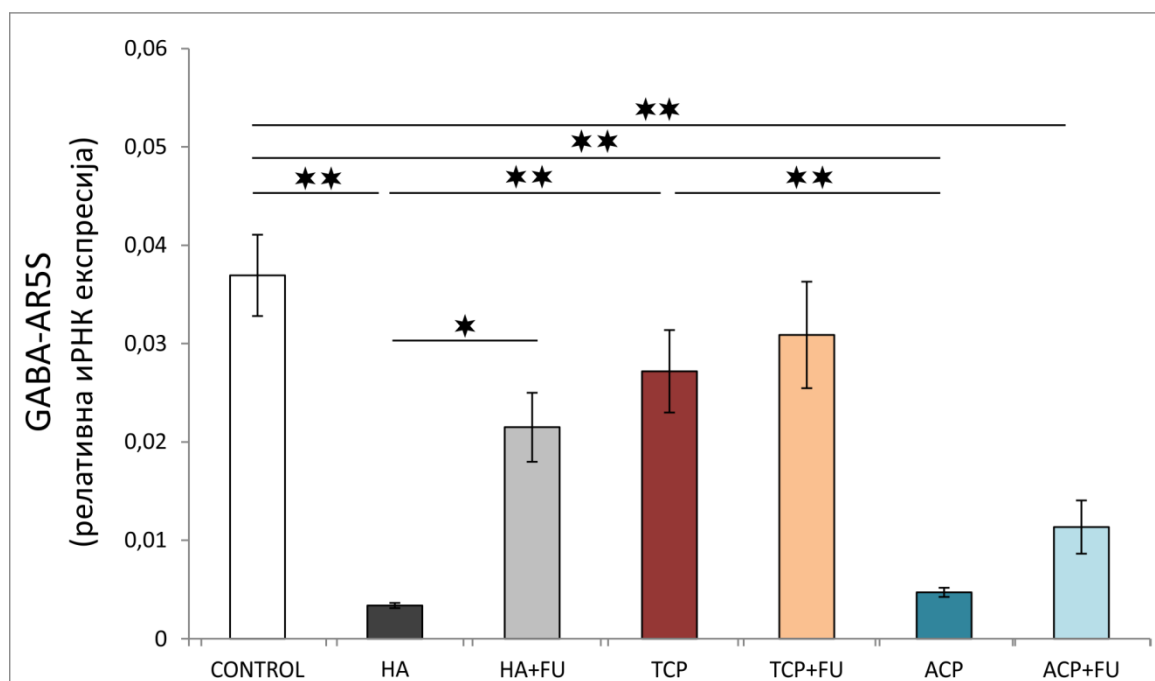
Слика 4.51. Промене броја GABA-AR2S имунореактивних ћелија на површини укупног пресека хипокампуса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; n=7 по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара ± стандардна грешка, *p<0.05, **p<0.01.

4.5.2. Релативна генска експресија иРНК за GABA-A и број GABA-A имунореактивних ћелија у ткиву префронталног кортекса

4.5.2.1. Утицај примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на промене релативне генске експресије иРНК за GABA-AR2S у ткиву префронталног кортекса изазване наночестицама калцијум фосфата

Релативна генска експресија иРНК за GABA-AR2S, као што је приказано на Слици 4.52., значајно је измењена примењеним протоколима студије. ($F=14.471$, $df=6$).

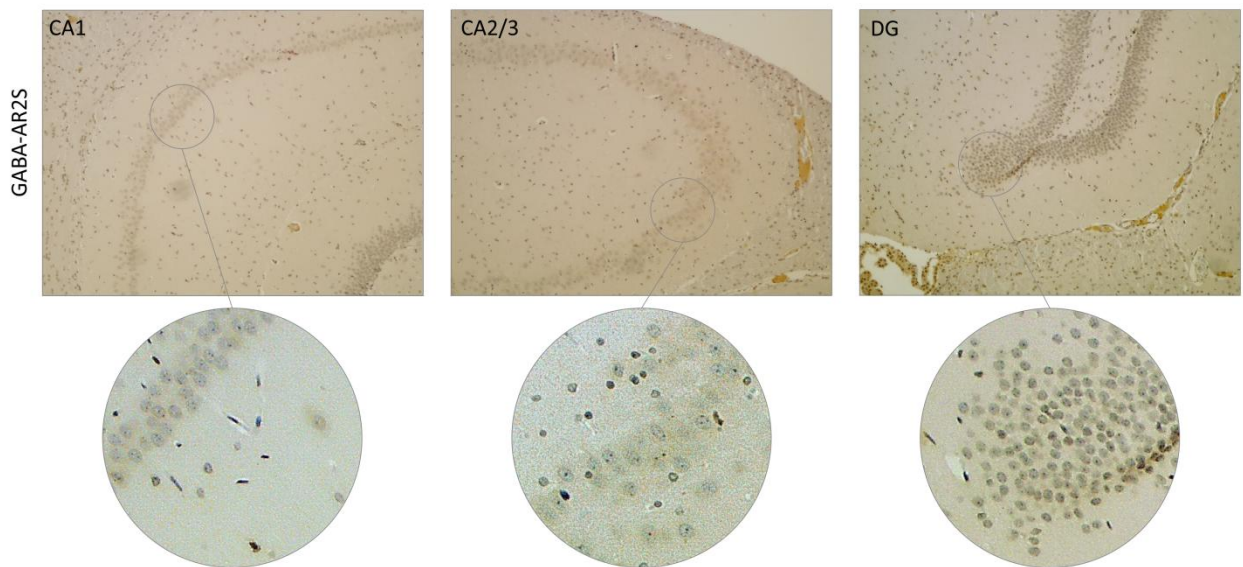
Наночестице HA и ACP значајно су смањиле експресију GABA-AR2S према контроли ($p<0.01$), док смањење вредности изазвано наночестицама TCP није било значајано. Занимљиво је да је смањење GABA-AR2S генске експресије примењено при примени нано-HA и ACP било значајно чак и у поређењу са вредностима добијеним код животиња третираних наночестицама TCP ($p<0.01$). Додатак антиоксиданса, екстракта биљке FU, значајно је обновио експресију GABA-AR2S у HA групи ($p<0.05$), али није успео да обнови експресију GABA-AR2S гена у ACP групи у којој су вредности остале значајно испод контролних ($p<0.01$).



Слика 4.52. Промене релативне генске експресије иРНК за GABA-AR2S у ткиву префронталног кортекса код пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. CONTROL – контролна група, HA – група са хидроксиапатитом, TCP – група са трикалцијум фосфат хидратом, ACP – група са аморфним калцијум фосфатом, HA+FU – група са хидроксиапатитом и екстрактом биљке FU, TCP+FU – група са трикалцијум фосфат хидратом и екстрактом биљке FU, ACP+FU – група са аморфним калцијум фосфатом и екстрактом биљке FU; $n=7$ по групи. Стубићи дијаграма репрезентују средње вредности параметара \pm стандардна грешка, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

На Слици 4.53., уочава се различит степен ефекта спроведених протокола на експресију имунореактивних ћелија за GABA-AR2S у префронталном кортексу пацова.

Третман нано-калцијум фосфатима је довео до смањења броја имунореактивних ћелија у поређењу са контролном групом, при чему се најизраженији ефекат уочава након примене наночестица НА. Такође, приметно је да је удружени третман екстрактом биљке FU и нано-калцијум фосфатима довео до повећања броја имунореактивних ћелија у префронталном кортексу пацова.



Слика 4.53. Репрезентативне слике експресије GABA-AR2S (имунохистохемијско бојење) на пресецима префронталног кортекса пацова.

5. ДИСКУСИЈА

5.1. Бихевиоралне манифестације дејства наночестица калцијум фосфата примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim

5.1.1. Промене степена анксиозности након примене нано-калцијум фосфата примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim

Узимајући у обзир претходно представљене резултате ове студије уочава се јасан анксиогени ефекат примењених наночестица калцијум фосфата. Кроз директне и индиректне параметре одговарајућих бихевиоралних тестова потврђене су наглашене промене анксиозности. Међутим, упоредна анализа анксиогеног деловања нано-калцијум фосфата упућује на значајан утицај хемијског састава на најдиректније показатеље анксиозности. Тако је тридесетодневни унос нано-НА и АСР редуковао активност испитиваних животиња у централној зони арене OF теста, смањујући вредности УВЦЗ и БУЦЗ параметара, што се није десило применом нано-ТСП (Слике 4.1-2). Продужено време које су животиње провеле у отвореним крацима уздигнутог крстастог лавиринта, са повећањем фреквенције уласка, још прецизније су нагласили да међу примењеним калцијум фосфатима АСР показује најизраженији анксигени ефекат (Слика 4.8). Ослањајући се на податке из литературе који потврђују да смањење локомоторне и експлоративне активности може представљати знак анксиозности (237), наведена анализа директних параметара који упућују на анксиогени ефекат хроничне, оралне примене наночестица калцијум фосфата налази упориште и у резултатима индиректних индикатора анксиозности спроведених тестова. Смањење укупног пређеног пута у тесту отворенг поља (Слика 4.3), као и пређеног пута заједно са смањеним временом кретања у тесту уздигнутог крстастог лавиринта (Слике 4.10-11), одраз су смањења локомоторне активности и проанксиозног деловања АСР. Додатну потврду анксиозног деловања нано-калцијум фосфата омогућиле су и промене у параметрима експлоративне активности. Администрација наночестица НА и АСР изазвала је значајно смањење броја слободних усправљања и укупног броја усправљана у OF тесту (Слике 4.6-7), као и броја незаштићених нагињања и броја епизода експлоративне активности (Слике 4.15-16), који упућују на смањење експлорације, што се сматра индиректном потврдом повећане анксиозност. Према резултатима спроведених тестова, администрација наночестица ТСП није дала промене ни у директним, ни у индиректним параметрима анксиозности.

Како су ефекти дејства нано-калцијум фосфата на централни нервни систем непознати, посебно потенцијална неуротоксичност са могућом појавом бихевиоралних манифестација, тумачење добијених резултата о променама у понашању могу се анализирати кроз позната бихевиорална испољавања дејства наночестица другачијег хемијског састава. Тако су резултати испитивања субакутне токсичности нано- TiO_2 , примењеног интраперитонеално, током 20 дана, потврдили његову неуротоксичност повећањем индекса анксиозности, са смањеним бројем улазака и редуковањем времена проведеног у отвореним крацима током ЕРМ теста, а који су такође били праћени променама у локомоторности и параметрима експлорације (238). Такође, анксиогени ефекат имала је и тридесетодневна, парентерална примена нано- TiO_2 , инхибирајући локомоторну активност мишева, смањењем укупног пређеног пута у централној зони

OF теста (239). Смањењем времена проведеног у отвореним крацима током ЕРМ теста показана је дозно-зависна анксиозност индукована хроничном, оралном применом нано-ZnO (123). И примена наночестица сребра узроковала је смањење фреквенце улазака у отворене краке уздигнутог крстастог лавиринта, не мењајући време имобилности, што би се такође могло сматрати анксиозним деловањем (240).

Према добијеним резултатима наше студије, суплементна примена антиоксиданса, садржаног у екстракту биљке FU, деловала је протективно на испитиване обрасце понашања, ублажујући или поништавајући анксиозно деловање нано-калцијум фосфата. Удружена примена антиоксиданса са наночестицама калцијум фосфата, очувала је вредности параметара добијених OF и ЕРМ тестом, на нивоу контролних. Иако се применом антиоксиданса заједно са нано-калцијум фосфатима није променио образац понашања, оличен у директним и индиректним параметрима анксиозности, протективно деловање екстракта биљке FU се може тумачити једино у поређењу са резултатима у групама где су потврђене промене параметара анксиозности при самосталној примени нано-калцијум фосфата.

Тако су директни показатељи анксиозности, УВЦЗ и БУЦЗ OF теста, УБОК и БУОК ЕРМ теста, поправљени деловањем антиоксиданса при примени са нано-НА и још значајније са нано-АСР (Слике 4.1-2, 4.8-9). Док су индиректни параметри анксиозности, изражени кроз експлоративну активност, очувани антиоксидативном суплементацијом по истом обрасцу као и директни (Слике 4.5-7, 4.12-16). Промењена локомоторна активност деловањем наночестица АСР поништена је ефектима екстракта биљке FU, чиме је дошло до повећања укупног пређеног пута и времена кретања у уздигнутом крстастом лавиринту (Слике 4.3-4, 4.10-11).

Описани благотворни ефекти антиоксидативне суплементације на бихевиоралне аспекте неуротоксичности, изазване наночестицама калцијум фосфата, могу се довести у везу са већ постојећим подацима из литературе о променама у нивоу анксиозности испољених након примене природних антиоксидативних продуката заједно са другим металним честицама нано-величине. У истраживању које је укључивало примену нано-TiO₂ поред показаног смањења локомоторне и експлоративне активности у OF тесту као и смањења вредности директних показатеља анксиозног понашања, потврђено је и повећање липидне пероксидације са оксидативним оштећењем ДНК, праћено смањењем антиоксидативне заштите у хипокампусу пацова. Са друге стране, примена етарског уља биљке *Citrus bergamia*, познатог антиоксидативног потенцијала, успела је да поништи штетне ефекте деловања нано-TiO₂, повећа укупан пређени пут и фреквенцу уласка у централну зону арене OF теста са истовременим успостављањем оксидативног баланса (181).

5.1.2. Промене степена депресивности након примене нано-калцијум фосфата примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim

Резултати ове студије недвосмислено су потврдили утицај нано-калцијум фосфата у повећању нивоа депресивности. Хронични орални унос нано-НА и нано-АСР значајно је смањило латенцију до прве имобилности, са снажнијим утицајем нано-НА у односу АСР (Слика 4.17), док ниједан од примењених протокола није значајно утицао на број епизода имобилности и просечно трајање епизода имобилности (Слике 4.18, 4.20). Појединачна примена нано-калцијум фосфата имала је различит утицај на укупно трајање имобилности (Слика 4.19). Тако су нано-НА и АСР значајно повећали овај главни маркер депресије у TS тесту, поново наглашеније при деловању нано-НА у односу на нано-АСР. Такође, како примена нано-ТСР није променила ни један параметар у TS тесту, могло би се закључити да према протоколима студије нано-ТСР није показао продепресантно дејство.

Иако описани резултати показују евидентан утицај хемијског састава на развој депресивног понашања, у литератури нису доступни подаци упоредних испитивања бихевиоралних манифестација неуротоксичности са којима би се наши резултати могли поредити. Међутим, када се сагледају сличности у дејству нано-калцијум фосфата са ефектима деловања металних наночестица на промену нивоа депресивности, уочава се да управо нановеличина честица игра значајну улогу. Тако је најчешће испитивано метално једињење, нано- TiO_2 , произвело негативан ефекат на понашање глодара испољен продепресантним дејством. Наиме, пренатална експозиција наночестицама TiO_2 , испитивана у студији на пацовима, узроковала је смањење нивоа антиоксидативне заштите са повећњем оксидативног оштећења липида и нуклеинских киселина у хипокампусу новорођених младунаца, што је за последицу имало депресивно понашање током зрелог доба (122). До сличних ефеката довела је и примена нано- TiO_2 код гравидних мишева, код чијих младунаца је потврђен пораст времена имобилности у тесту качења за реп (241). Такође, повећање степена депресивности, у нивоу који је био зависан од примењене дозе и пола мишева, узроковала је и пренатална изложеност наночестицама ZnO i Ag (242, 243).

Узимајући у обзир претходно коментарисане резултате, чини се важним истаћи да је уочени образац понашања успешно спречен истовременим деловањем антиоксиданса са калцијум фосфатима. Продепресантно деловање нано-калцијум фосфата успешно је спречено дејством екстракта биљке FU, који је повећао латенцију до прве имобилности са смањењем укупног трајања имобилности код животиња које су примале нано-НА, као и нано-АСР (Слика 4.17). Међутим, ну у једном ранијем истраживању није коришћења антиоксидативна суплементација за процену потенцијалне улоге оксидативног стреса у механизму развоја поремећаја у понашању, са чијим резултатима би се могли поредити ефекти дејства екстракта биљке FU на промене у нивоу депресивности изазване нано-калцијум фосфатима.

5.1.3. Промене у когнитивним функцијама након примене нано-калцијум фосфата примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim

Узимајући у обзир претходно коментарисане резултате, није изненађујуће да су и когнитивне функције праћене у овој студији биле погођене хроничним уносом наночестица калцијум фосфата. Значајно когнитивно оштећење, кроз анализу способности препознавања новог предмета, примећено је само под дејством наночестица АСР, док примена нано-НА и ТСР није утицала на способност памћења тестираних животиња. Хронични, системски третман наночестицама АСР узроковао је смањење броја улазака у зону новог објекта, као и времена које су животиње провеле окренуте ка новом објекту, док је укупно време проведено у овој зони остало очувано (Слике 4.1-3).

Како литература не нуди податке о дејству нано-калцијум фосфата на централни нервни систем, претходно описане промене у когницији можемо упоређивати само са утицајем наночестица других металних једињења, пошто су бројне студије испитивале ефекте деловања наночестица различитог хемијског састава на учење и памћење. Као што је и раније наглашено, највећи број истраживања бихевиоралних манифестација неуротоксичности, изазваних наночестицама, бавио се ефектима дејстава нано- TiO_2 . Тако је показано да је пренатална примена нано- TiO_2 смањила когнитивне способности пацова, због чега су проводили мање времена у зони новог објекта NOR теста, док су промене у понашању биле праћене и променама у оксидативном статусу хипокампуса (122). Такође, пренатална примена нано- TiO_2 изазвала је инхибицију у развоју великог мозга, измењеном експресијом протеина (Rac1, Cdc42 и Rho A), која је смањила број аксона и дендритично гранање у хипокампусу и као последицу дала смањење способности учења и памћења (244). Наночестице CuO и Al_2O_3 изазвале су оштећења когниције удружена са повећањем липидне пероксидације, смањењем антиоксидативне заштите (126, 183) и повећањем проапоптотских маркера у хипокампусу пацова (127). Смањене когнитивне способности примећене су и код мишева третираних наночестицама сребра (245).

Поред примењених промена у понашању изазваних нано-калцијум фосфатима, когнитивне функције су додавањем екстракта биљке FU третману остале очуване чак и при симултаном примени са наночестицама АСР (Слике 4.1-3). Међутим, овакви резултати се могу сматрати очекиваним, пошто је познато да природни антиоксиданси могу побољшати когнитивне функције, претходно умањене дејством металних наночестица. Слично позитивном утицају на анксиозно понашање, етарско уље биљке *Citrus bergamia* значајно је поправило способност учења и памћења пацова изложених нано- TiO_2 , продужујући време које су провели у зони новог објекта NOR теста, што се може довести у везу са смањењем оксидативних оштећења изазваних наночестицама (181). Суплементни антиоксидативни третман соком од нара, извором полифенола, узроковао је побољшање у свим параметрима когниције промењених третманом наночестицама CuO . Штавише, овај природни антиоксиданс је уједно смањивао и ниво оксидативног оштећења ћелија мозга помоћу појачане регулације експресије *HO-1* и *Nrf2* гена, са последичним смањењем апоптозе (182).

5.1.4. Промене у ноцицепцији изазване дејством нано-калцијум фосфата примењених самостално или удружено са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim

Примена нано-калцијум фосфата довела је до промене у одговору на термичке стимулусе бола. Хронична примена нано-НА и АСР резултирала је значајним смањењем реактивности на термички стимулус у *hot palate* тесту, без значајне промене примећене код животиња које су примале нано-ТСП (Слика 4.25). Међутим, промене у ноцицепцији биле су више изражене током *tail flick* теста, којим је показана смањена латентност реаговања након примене све три минералне супстанце, при чему је реакционо време било нешто дуже након третмана нано-ТСП у односу на третман нано-НА и АСР (Слика 4.24).

Иако не постоје подаци о ефектима нано-калцијум фосфата на централни нервни систем, претходне студије указују да би системска примена наночестица других метала могла значајно да утиче и на периферни и на централни нервни систем, укључујући и контролу ноцицепције (169). Kesmati и сарадници су показали да наночестице ZnO делују аналгетично кроз централне механизме регулације бола, када долази до повећања латентног времена у *hot palate* и *tail flick* тесту, без зависности од дозе при високим концентрацијама (246), што се даље објашњава високим нивоом засићења рецептора (247). Даљим истраживањима је закључено да је величина честица важан фактор који утиче на ноцицептивни одговор, пошто је нано-ZnO значајније продужио време до реакције у *hot palate* тесту у односу на конвенционални ZnO. Ово истраживање је показало да је аналгетски механизам нано-ZnO повезан са активацијом опиоидергичког систем (248). Такође, показано је да наночестице MgO и ZnO директно утичу на перцепцију бола кроз смањење нивоа глутамата, као ексцитаторног неуротрансмитера, док промене нивоа јона Mg^{2+} и Zn^{2+} , након инјекције наночестица MgO и ZnO, могу бити ефикасне у промени експресије гена за NR2A и NR2B субјединице NMDA рецептора у хипокампусу, са утицајем на различите механизме хипоалгезије (249). У литератури такође постоје докази да наночестице CuO изазивају антиноцицептивне ефекте, верификоване кроз повећање времена до реакције у *Hot plate* и *Tail flick* тесту (250).

Према резултатима наше студије, нешто израженији одговор на болне надражаје изазване топлотом у *Tail flick* тесту, у поређењу са ефектима добијеним у *Hot plate* тесту, може се сматрати потврдом да је неуротоксични ефекат нано-калцијум фосфата био израженији у ноцицептивним механизмима који претежно укључују периферне нерве. Међутим, недоследност добијених резултата са подацима из литературе може се приписати разликама у испитиваној врсти, старости и полу животиња, експерименталном дизајну, хемијским особинама примењених супстанци, њиховој дози и начину експозиције, као и избору параметара који су праћени и метода детекције промена.

Истовремена примена екстракта FU са нано-калцијум фосфатима очувала је уобичајену реактивност на термичке стимулусе код третираних животиња у *hot palate* и *tail flick* тесту. Заштитно деловање антиоксидативне суплементације на ноцицептивне механизме посебно је примећено у продужењу времена до реакција након симултаног третмана екстракта биљке FU са нано-НА и АСР, који су при самосталној примени довели до хипералгезијског исхода (Слике 4.24-25).

Како је доза екстракта биљке FU коришћена у овој студији изабрана на основу претходно потврђеног антиоксидативног дејства код исте врсте (203), неуропротективно деловање екстракта биљке FU, изражено повећањем латенције у

одговору током оба теста, могло би се приписати утицају на претпостављене механизме оксидативних оштећења насталих применом наночестица калцијум фосфата са могућим дејством на габаергички систем, као главни инхибиторни механизму у централном нервном систему, који су уосталом потврђени и код примене других металних наночестица. Поред тога, према резултатима наше студије, чини се да је суплементација екстрактом биљке FU показала значајније антиоксидативне ефекте на нивоу контроле ноцицепције до нивоа кичмене мождине. Истовремено, иако је додатак природних антиоксидативних производа спречио хипералгезијски ефекат нано-калцијум фосфата у *Hot plate* тесту у поређењу са контролом, давање екстракта биљке FU није укључивало значајан утицај на ноцицепцију у поређењу са групама које су примале само наночестице калцијум фосфата. Могуће објашњење за посматрани феномен може се наћи у чињеници да су централни механизми за контролу бола комплексније организовани и под утицајем различитих механизма који би могли бити погођени дејством наночестица калцијум-фосфата.

5.2. Прооксидантно деловање нано-калцијум фосфата и протективно дејство екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на оксидативне механизме у МОЖДАНОМ ТКИВУ

Увођење честица нановеличине у медицинске процедуре удружено је са појавом различитих патофизиолошких механизма, укључујући оксидативи стерс и апоптозу. Наночестице захваљујући малим димезијама и реципрочно великој релативној површини остварају специфичне односе са компонентама биолошког окружења. Међутим, у узроковању патофизиолошких промена ово критично смањење у димензијама честица нагласило је и значај других особина примењених супстаци, као што су хемијски састав, хемијске особина, облик, растворљивост.

Резултати наше студије снажно су потврдили да честице калцијум фосфата, нано-величине, изазивају оксидативно оштећење ћелија мозга, са значајним разликама у променама вредности маркера оксидативног стреса у зависности од хемијских својстава примењених минералних једињења. Пероксидација липида била је појачана са сва три једињења калцијум фосфата. Међутим, добијени резултати указују да примењене супстанце нису подједнако утицале на ензимски и неензимски антиоксидативни капацитет. Док наночестице TCP нису имале значајног ефекта, а нано-НА утицао највише на CAT и GSH, нано-ACP је индуковао укупно смањење испитиваних антиоксидативних механизма (SOD, CAT и GSH) (Слике 4.30-33, 4.26-29).

Иако механизам дејства нано-калцијум фосфата није у потпуности разјашњен, према резултатима досадашњих истраживања чини се да оксидативни дисбаланс има кључну улогу у оштећењу ћелија. Међутим, пошто у литератури нема упоредних података о оксидативном оштећењу ћелија изазваних нано-калцијум фосфатима различитог хемијског састава, добијени резултати ове студије се могу поредити са подацима из истраживања у којима су коришћене појединачне супстанце.

Нано-хидроксиапатит представља клинички најчешће коришћену супстанцу за надокнаду минерализованих ткива, па не чуди што је у највећем броју истраживања испитиван механизам дејства управо овог калцијум фосфата. Тако је прооксидативно деловање наночестица НА показано кроз *in vitro* студију на MC3T3-E1 ћелијској линији остеобласта, чији резултати потврђују да је примена нано-НА повећала продукцију ROS и смањила ензимски антиоксидативни капацитет редуковањем активности SOD и GPx (129). Слични резултати добијени су и применом нано-НА у различитим дозама на C6 ћелијској линији, који су били праћени повећаном продукцијом ROS и смањеном активношћу SOD, где је доказан и дозно зависни ефекат дејства (171). Са друге стране, прооксидативни ефекат дејства нано- β -TCP, верификован кроз повећану продукцију ROS, потврђен је на ћелијама хепатоцелуларног карцинома (165).

Како је већ нагласило примена честица нано-величине наглашава утицај бројних особина примењених терапеутика. Тако је у истраживању дејства нано-НА на остеобласте потврђено обимно стварање ROS, док је ова промена, као и оштећење ћелија било директно зависно од Ca/P односа нано-НА (131), као и од дозе и морфологије примењеног калцијум фосфата (130).

Малобројни су подаци који узимају у обзир оксидативне ефекте калцијум фосфата другачијег хемијског састава, укључујући и TCP и ACP. Такође, поред поменутих базичних испитивања механизма дејства, у литератури не постоје резултати *in vivo* истраживања о утицају нано-калцијум фосфата на маркере

оксидативног стреса, како у централном нервном, тако ни у другим органским системима, због чега уочене промене можемо упоредити само са дејством других металних честица нано-величине. Резултати ове студије су у складу са претходно доказаним оксидативним променама у централном нервном систему, које су настале након примене наночестица ZnO (251), CuO (252), Ag (253) и TiO₂ (254). У истраживању спроведеном на пацовома третираним наночестицама ZnO показан је дозно-зависни ефекат примењених супстанци у оксидативном оштећењу ћелија хипокампуса, праћен значајном липидном пероксидацијом са повећаним вредностима MDA и оштећењем антиоксидативног капацитета, кроз смањење активности SOD и CAT, као и редукцијом неензимске заштите изражене вредностима GSH (123). Са друге стране, резултати истраживања ефекта дејства CuO и TiO₂ на хипокампус пацова дали су сличне резултате промена у оксидативном статусу. Док су наночестице оба једињења изазвала снажну липидну пероксидацију мембрана са значајним повећањем MDA и смањењем активности SOD и GSH-Px, за дејство наночестица CuO потврђена је повећана продукција супероксид анјон радикала (O⁻) и хидроксил радикала (OH⁻) (126), а за TiO₂ утврђено је смањење укупног антиоксидативног капацитета (121, 122). Спроведена истраживања на линијама зрнастих ћелија малог мозга показала су да наночестице Ag изазивају оксидативни стрес, што се одражава значајном генерацијом реактивних кисеоничних врста (ROS), исцрпљивањем неензимског антиоксидативног капацитета (GSH), променама митохондријалног мембранског потенцијала и повећањем унутарћелијског калцијума, при чему су промене значајно зависиле од примењене дозе (119, 120), док су резултати добијени у *in vitro* студијама потврђени и кроз *in vivo* истраживање на пацовима (120)

Примена екстракта биљке FU успела је да повећа активност антиоксидативних ензима, која указује на обнављање ћелијског антиоксидативног капацитета, док се исцрпљивање неензимског антиоксидативног одбрамбеног система, изражено кроз GSH, није успешно обновило у хипокампусу испитиваних пацова. Са друге стране, оксидативно оштећење у префронталном кортексу изазвано нано-калцијум фосфатима значајно је умањено симултаним третманом екстрактом биљке FU. Дакле, додаток антиоксиданса заједно са честицама калцијум фосфата спречио је смањење активности антиоксидативних ензима, као и садржаја GSH у префронталном кортексу, али су вредности за пероксидацију липида, иако смањене, остале изнад контролних (Слике 4.30-33, 4.26-29). Од значаја је да је у оба испитивана ткива протективно дејство екстракта биљке FU, као антиоксидативног суплемента, било најизраженије у смањењу нивоа липидне пероксидације, као мере оксидативног оштећења, и активност каталазе, као мере ензимске антиоксидативне заштите, управо при симултаном примени са наночестицама АСР које су и изазвале највеће оксидативно оштећење ћелија.

Заштитно дејство природних антиоксиданаса, уочено је и у *in vitro* истраживању на ћелијама глиома, где је поред потврђеног учешћа нано-НА у оксидативном оштећењу, праћеног порастом ROS и смањењем ензимског антиоксидативног потенцијала, примена N-MPG антиоксиданса успела да поништи прооксидативно дејство наночестица НА (171). Међутим, како у литератури нема података о процени утицаја антиоксидативне суплементације на оксидативни дисбаланс изазван наночестицама калцијум фосфата у централном нервном систему, са којима би смо упоредили добијене резултате, можемо их само довести у везу са побољшањем оксидативних параметара у ћелијама можданог ткива, постигнутим различитим фитохемијским једињењима, који су претходно били промењени дејством металних наночестица. На линији ћелија хипокампуса HT22 потврђено је прооксидативно дејство наночестица CuO, али и заштитна улога кроцетина, пореклом из гарденије и шафрана, у очувању оксидативног баланса. Заправо, према резултатима овог истраживања, нано-

CuO је узроковао смањену генску експресију SOD и GPx удружену са смањењем активности антиоксидативних ензима SOD, GST, GSH, GPx и повећањем продукције ROS, док је примена кроцетина, као антиоксидативног суплемента, успела да поништи ефекте дејства наночестица примењеног металног оксида (125). Такође, утицај антиоксидативне суплментације на прооксидативне ефекте наночестица Ag, праћене повећањем синтезе ROS, потврђен је и на ембрионалним нервним ћелијама пацова, на којима је примена ацетил-L-карнитина, као антиоксиданса природног порекла, онемогућила штетно деловање сребра (253). Кроз *in vivo* истраживања такође је потврђена заштитана улога природних продуката у очувању оксидативног баланса при деловању металних наночестица. Тако је према резултатима студије спроведене на пацовима, у ткиву мозга, након системске администрације наночестица Ag, дошло до повећања MDA и смањења активности SOD, CAT, GSH, GPx, док је примена рутина, флавоноида садржаног у воћу, успешно очувала оксидативни баланс (118). Слични резултати постигнути су и допунским третманом хесперидином, пореклом из цитрусног воћа, којим су параметри липидне пероксидације и антиоксидативне заштите, измењени системском применом наночестица ZnO, успешно попраљени (124). Дејство нано-TiO₂, испољено кроз повећање оксидативног оштећења ћелија и смањење оксидативне заштите хипокампуса пацова, успешно је поништено суплментацијом етарским уљем биљке *Citrus bergamia* (181) и екстрактом добијеним из семена биљке *Moringa oleifera* (254). Такође, прооксидативно дејство нано-CuO поништено је симултаном применом сока нара (182).

5.3. Проапоптотско деловање нано-калцијум фосфата и протективно дејство екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на механизме апоптозе у мозданом ткиву

Постоји мноштво доказа да оксидативно оштећење значајно утиче на равнотежу између про- и анти-апоптотских фактора (255). Управо повезаност оксидативног дисбаланса и апоптозе анализирана је у бројним истраживањима дејства наночестица укључујући и нано-калцијум фосфате. Оксидативни стрес, као иницијатор апоптозе, идентификован је у базичним испитивањима карактеристика оштећења МС3Т3-Е1 остеобласта насталих дејством нано-НА, при чему се као основни механизам ћелијске смрти уочава лизозомски и митохондријални пут апоптозе, као и директно оштећење ДНК ендогеним ROS (129, 130). Такође, повећана продукција ROS имала је значајну улогу у индукцији апоптозе ћелија хепатоцелуларног карцинома, развијене унутрашњим сигналним путем, под дејством нано- β -ТСР (165). Иако је потврђена повезаност између оксидативног стреса и апоптозе ћелија глиома под дејством нано-калцијум фосфата, тачна улога ROS у оштећењу ћелија мозга утврђена је при примени наночестица другачијег хемијског састава. Подаци из литературе сугеришу да је нано-Ag индукује смрт зрнастих ћелија малог мозга пацова апоптозом, посредованом каспаза зависним сигналним путем, који је био покренут механизмом оксидативног стреса (120). Такође, унутрашњи апоптотски пут инициран повећаном генерацијом ROS представља и механизам смрти ћелија хипокампуса пацова насталих након системске примене наночестица CuO (126).

Сагледавајући резултате за маркере оксидативног стреса добијене у овој студији, није изненађујуће што су примењени протоколи који укључују примену наночестица калцијум фосфата резултирали наглашеним проапоптотским исходом у хипокампусу третираних животиња (Слике 4.34-36). Наиме, док је директан утицај примењених неорганских једињења на повећање релативне експресије гена за Вах био значајан само у АСР групи, примена сва три калцијум фосфата дала је умањење релативне експресије гена за Bcl-2. Идентичан ефекат на апоптозу нано-АСР је имао и у префронталном кортексу, док је дејство наночестица НА и ТСР било мање изражено, иако су сва три једињења променила вредности и проапоптотских и антиапоптотских маркера (Слике 4.37-39).

Добијени резултати су у складу са подацима ранијих истраживања који су проучавали механизме апоптозе изазване калцијум фосфатима. Иако су спроведена бројна испитивања дејства нано-калцијум фосфата, углавном НА, још увек не постоји сагласје о прецизном механизму оштећења ћелија. Испитивања бројних фактора указала су да апоптоза узрокована нано-калцијум фосфатима може бити посредована и спољашњим и унутрашњим путевима.

Досадашња истраживања су показала да се нано-калцијум фосфати, транспортовани ендоцитозом претежно у лизозоме, растварају дајући повећане концентracије интрацелуларног калцијума који покрећу апоптозу (160, 165). Поред тога, уочено је и да повећани унутарћелијски PO_4^{3-} индукује апоптозу модулацијом потенцијала митохондријске мембране (256). Такође, примена нано-НА узроковала је повећање TNF α на ћелијској линији остеобласта (163), као и у бубрезима пацова (96, 167), што је било праћено повећањем Вах (167) и p53 (96). Међутим, бројна *in vitro* и *in vivo* истраживања указују да унутрашњи пут апоптозе предстаља основни механизам ћелијске смрти изазване наночестицама калцијум фосфата (156). Тако је након примене

нано-НА на ћелијској линији остеобласта, уз промене у оксидативном статусу, уочено повећање експресије проапоптотског Вах и смањење антиапоптотског маркера Bcl-2, праћено повећањем каспазе 3 који указују на митохондријални пут развоја апоптозе, док повећање катепсина В указује на лизозомски пут оштећења ћелије. Такође, у овој студији је потврђено и оксидативно оштећење ДНК као потенцијални механизам развоја апоптозе (171).

Подаци из литературе указују да бројне карактеристике примењених наночестица значајно утичу на апоптотске механизме у различитим ткивима. Примена честица нано-НА, различитог дијаметра, у култури остеобласта потврдила је да честице веће релативне површине узрокују повећану продукцију p53, уз повећање цитосолног и смањење митохондријалног цитохрома С (130), као и смањење Bcl-2 маркера апоптозе (257). Када се анализира утицај хемиског састава калцијум фосфата, уочава се да, за разлику од ефекта дејства наночестица НА, примена нано-АСР на ћелије леукемије довела је до заустављања ћелијског циклуса у G1 фази, док су ефекти дејства директно зависили од дужине изложености (159). Такође, ћелијски циклус хепатоцелуларног карцинома је блокиран дејством нано-β-TCP у G1 фази, док су ове ћелије у *in vivo* условима реаговале повећаном продукцијом Вах, смањењем Bcl-2 и повећањем каспазе 3 (165). Утицај хемијских особине примењених једињења, у смислу Ca/P односа, испитивани су кроз примену нано-НА у *in vitro* истраживањима на остеобластима, када је показано да се са повећањем вредности овог односа повећава и продукција NO са последичним смањењем вијабилности ћелија и повећањем нивоа апоптозе (131). Такође, повећан ниво апоптозе изазвали су и нано-калцијум фосфати мањег степена кристализације (160).

Да би се разјаснило проапоптотско деловање калцијум фосфата нано-величине, примењено у овој студији, треба напоменути да су и наночестице других металних једињења, као што је CuO (125), такође појачала апоптозу у HT22 ћелијама хипокампуса регулацијом Вах и Bcl-2 маркера, док је нано-Ag у зрнстим ћелијама малог мозга изазвао дозно-зависно повећање интрацелуларног калцијума, праћено смањењем митохондријалног мембранског потенцијала и порастом нивоа каспазе 3, са последичним смањењем вијабилности ћелија (119, 120). Даље, *in vivo* студије које су процењивале утицај нано-калцијум фосфата на апоптозу спроведене су само са НА и TCP, али без специфичних података о њиховом дејству на мождано ткиво, због чега се добијени резултати могу упоредити са подацима из испитивања апоптотских ефеката металних наночестица на мождано ткиво. Досадашња истраживања указују да су наночестице CuO изазвала апоптозу са повећањем каспазе 3 у ткиву хипокампуса (126), док је нано- Ag индуковао морфолошки верификовану апоптозу у малом мозгу пацова (120).

Суплементација антиоксидансима биљке FU била је ефикасна у смањењу релативне експресије проапоптотских и повећању експресије антиапоптотских гена, што је потврђено побољшањем односа Вах/Bcl-2 које је примењено у хипокампусу пацова након хроничне администрације наночестица калцијум фосфата. Међутим, како је у префронталном кортексу проапоптотски ефекат третмана нано-АСР био израженији него при примени наночестица НА и TCP, дејство екстракта биљке FU у антиапоптотској активности било је најизраженије при симултаном примени са АСР, иако је вредност односа Вах/Bcl-2, као индикатора нивоа апоптозе, била значајно смањена код удружене примене антиоксиданса и сва три калцијум фосфата.

Иако не постоје подаци о благотворном ефекту антиоксидативне суплементације на апоптозу у можданом ткиву изазвану нано-калцијум фосфатима, овај ефекат је потврђен у ткиву бубрега пацова, где је као природни антиоксиданс-екстракт биљке цикорија (*Cichorium inhibitus*) довео до смањења нивоа проапоптотског модулятора Вах

(167), док су биоактивна једињења куркумин и хитосан смањила вредности p53, TNF α (96). Добијени резултати дејства екстракта биљке FU у модулацији апоптотског одговора ћелија мозга на дејство нано-калцијум фосфата могу се упоредити са резултатима *in vitro* студија које су процењивале ефекте антиоксидативне суплементације третмана металним наночестицама. Тако је примена кроцетина довела до повећане виабилности ћелија смањујући релативну генску експресију за Вах и повећавајући је за Bcl-2 фактор апоптозе ћелија хипокампуса примарно индуковане дејством наночестица CuO (125), док је проапоптотско дејство нано-Ag на ембрионалне нервне ћелије поништено смањењем експресије Вах симултаном применом природног антиоксиданса ацетил-L-карнитина (253). Истраживања на животињама такође су потврдила благотворно дејство природних антиоксидативних продуката у умањењу апоптотских ефеката примене наночестица, у којима је сок нара смањило експресију каспазе 3, претходно повећану дејством наночестица CuO (182), а екстракт биљке *Moringa oleifera* смањило експресије каспазе 3, IL1 β и TNF α које су биле промењене дејством нано-TiO₂ (254)

5.4. Утицај нано-калцијум фосфата и заштитна улога *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. у експресији BDNF и GABA-AR

Проапоптотско дејство сва три нано-калцијум фосфата примењена у овој студији праћено је смањењем BDNF у ткиву мозга (хипокампус и префронтални кортекс) (Слике 4.40-46). Иако је добро познато да BDNF има антиапоптотски потенцијал у различитим ткивима (258), укључујући централни нервни систем (259), забележено је да сама апоптоза, посебно у регионима одговорним за производњу BDNF, може значајно смањити неурогенезу (260), тако да утичу на садржај BDNF.

Резултати наше студије заиста су потврдили да третмани наночестицама НА и АСР, који су резултирали изразитим проапоптотским исходом, такође су дали најнижу имунореактивност за BDNF како у хипокампусу тако и у префронталном кортексу. Даље, с обзиром да је BDNF високо одговоран за хипокампаљну неурогенезу (261), није изненађујуће да су и GABA А рецептори такође били на најнижем нивоу у групама (НА и АСР) са евидентним проапоптотским деловањем и смањењем регулације BDNF, док наведене промене нису биле значајне при примени нано-ТСП (Слике 4.47-53). Наши резултати се такође слажу са потврђеном везом између повећања BDNF и регулације габаергичног система (262).

С обзиром да у литератури не постоје подаци о утицају наночестица калцијум фосфата на BDNF и габаергични систем у можданом ткиву, добијене резултате можемо упоредити само са утицајем наночестица сребра. Дакле, показано је да су наночестице сребра произвеле значајано смањење различитих моноаминских неуротрансмитера, укључујући GABA, у хомогенату мозга пацова (118), као и да су инхибирале BDNF сигнализацију у ћелијској линији хуманог неуробластома SH-SI5I (263).

Такође, резултати ове студије су показали да је истовремено додавање антиоксиданса, екстракта биљке FU, ублажило смањење експресије BDNF и GABA-AR2S, са најзначајнијом променом при симулатној примени антиоксиданса и наночестица АСР (Слике 4.40-53). Зато је од значаја податак да је додаток антиоксидативног суплемента рутина третману наночестицама сребра спречио смањење нивоа моноаминских неуротрансмитера (118).

5.5. Повезаност промена у понашању, оксидативног стреса, апоптотских маркера и експресије BDNF и GABA-AR као одговора на дејство нано-калцијум фосфата

Резултати бихевиоралних испитивања изведени у овој студији снажно су потврдили развој промена у понашању као одговор на системску примену нано-калцијум фосфата, са најизраженијим ефектом примећеним након третмана наночестицама НА и нарочито АСР.

Уочене бихевиоралне промене након продужене примене НА и АСР могу бити повезане са претходно разматраном регулацијом габаергичног система, израженом смањењем броја GABA-AR2S имунореактивних ћелија у свим истраженим регионима мозга. Резултати који узимају у обзир промене вредности испитиваних параметара понашања које очигледно одговарају експресији GABA-AR2S у складу су са претходно забележеним доказима да габаергичка дисфункција има једну од кључних улога у патогенези различитих поремећаја расположења (264).

Штавише, вреди напоменути да постоје бројни докази о утицају неких других параметара процењених у овој студији који могу допринети регулацији нивоа анксиозности. Због тога је забележено да су експериментални протоколи који су резултирали прооксидативним (265) и проапоптотским (266) дејством у ткиву хипокампуса, истовремено значајно појачали анксиогени одговор, док је смањење регулације хипокампалног BDNF такође повезано са повећаном анксиозношћу (267).

Резултати који разматрају последице суплементације антиоксидансима, екстрактом биљке FU, потврдили су да овај терапијски приступ може деловати корисно у превенцији описаних промена расположења изазваних нано-калцијум фосфатима. Потенцијална заштитна улога екстракта биљке FU, у дози примењеној у овој студији, потврђена је слабљењем бројних фактора, измењених дејством примењених минералних једињења, попут оксидативног оштећења, појачане регулације антиапоптотских и смањене регулације проапоптотских фактора, као и повећане експресије хипокампалног BDNF и GABA-AR2S, који могу бити основа промена у понашању.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Анализом резултата добијених у овој студији могу се извести следећи закључци:

- Дуготрајна, орална примена наночестица калцијум фосфата повећава оксидативни стрес у ткиву мозга (хипокампус и префронтални кортекс)
- Оксидативни стрес изазван дејством наночестица калцијум фосфата повећава ниво апоптозе у ткиву мозга
- Апоптоза ћелија мозга смањује продукцију BDNF
- Смањење BDNF узрокује смањење експресије GABA A рецептора
- Редукција броја GABA A рецептора доводи до повећања анксиозности, повећања депресивности и удружена је са смањењем когнитивних способности
- Смањена експресија габаергичког система, главног инхибиторног механизма у централном нервном систему, може бити један од разлога за хипералгетски ефекат наночестица калцијум фосфата
- Примена екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., смањењем оксидативног оштећења, може умањити или превенирати ланац догађаја који за резултат имају испољавање бихевиоралних манифестација неуротоксичности изазване наночестицама калцијум фосфата

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Łukomska-Szymańska M, Kleczewska J, Nowak J, Pryliński M, Szczesio A, Podlewska M, Sokołowski J, Łapińska B. Mechanical Properties of Calcium Fluoride-Based Composite Materials. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2752506.
2. Kantharia N, Naik S , Apte S , Mohit K, Supriya K, Kale B. Nano-hydroxyapatite and its contemporary applications. *J Dent Res Sci Develop.* 2014; 1(1): DOI:10.4103/2348-3407.126135.
3. Stencel RR, Pakieła W, Barszczewska-Rybarek I, Żmudzki J, Kasperski J, Chladek G. Effects of different inorganic fillers on mechanical properties and degree of conversion of dental resin composites. *Arch. Metall. Mater.* 2018; 63(3):1361-1369.
4. Zhou X , Huang X, Li M, Peng X, Wang S, Zhou X, Cheng L., Development and status of resin composite as dental restorative materials. *J. Appl. Polym. Sci.* 2019;136:48180.
5. Maitin DSN, Maitin DN, Priyank DH, Raj DS. Evaluation of spectrophotometer analysis of bulk-fill composites in various daily used beverages. *Int J Med and Biomed Stud.* 2019;3(10):334-341.
6. Cramer NB, Stansbury JW, Bowman CN. Recent advances and developments in composite dental restorative materials. *J Dent Res.* 2011;90(4):402-16.
7. Jokstad A. Secondary caries and microleakage. *Dent Mater.* 2016; 32(1):11-25.
8. Shih WY. Microleakage in different primary tooth restorations. *J Chin Med Assoc.* 2016;79(4):228-34.
9. Nedeljkovic I, De Munck J, Vanloy A. Secondary caries: prevalence, characteristics, and approach. *Clin Oral Invest.* 2020; 24:683–69.
10. Chatzistavrou X, Lefkelidou A, Papadopoulou L, Pavlidou E, Paraskevopoulos KM, Fenno JC, Flannagan S, González-Cabezas C, Kotsanos N, Papagerakis P. Secondary caries: prevalence, characteristics, and approach. *Front Physiol.* 2018;16(9):103.
11. Gale MS, Darvell BW. Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. *J Dent.* 1999;27(2):89-99.
12. Nedeljkovic I, Teughels W, De Munck J, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL. Is secondary caries with composites a material-based problem? *Dent Mater.* 2015 Nov;31(11):e247-77.
13. Oginni AO, Adeleke AA. Comparison of pattern of failure of resin composite restorations in non-cariou cervical lesions with and without occlusal wear facets. *J Dent.* 2014;42(7):824-30.
14. Pajor K, Pajchel L, Kolmas J. Hydroxyapatite and Fluorapatite in Conservative Dentistry and Oral Implantology-A Review. *Materials (Basel).* 2019; 12(17):2683.
15. Braga RR. Calcium phosphates as ion-releasing fillers in restorative resin-based materials. *Dent Mater.* 2019;35(1):3-14.
16. Niu LN, Jiao K, Wang TD, Zhang W, Camilleri J, Bergeron BE, et al. A review of the bioactivity of hydraulic calcium silicate cements. *J Dent* 2014;42(5):517–33.
17. Vallittu PK, Boccaccini AR, Hupa L, Watts DC. Bioactive dental materials—do they exist and what does bioactivity mean? *Dent Mater* 2018;34(5):693–4.
18. Rodrigues MC, Chiari MDS, Alania Y, Natale LC, Arana-Chavez VE, Meier MM, Fadel VS, Vichi FM, Hewer TLR, Braga RR. Ion-releasing dental restorative composites

containing functionalized brushite nanoparticles for improved mechanical strength. *Dent Mater.* 2018;34(5):746-755.

19. Alania Y, Chiari MD, Rodrigues MC, Arana-Chavez VE, Bressiani AH, Vichi FM, Braga RR. Bioactive composites containing TEGDMA-functionalized calcium phosphate particles: Degree of conversion, fracture strength and ion release evaluation. *Dent Mater.* 2016;32(12):e374-e381.

20. Ibrahim MS, AlQarni FD, Al-Dulaijan YA, Weir MD, Oates TW, Xu HHK, Melo MAS. Tuning Nano-Amorphous Calcium Phosphate Content in Novel Rechargeable Antibacterial Dental Sealant. *Materials (Basel).* 2018; 11(9):1544.

21. Cheng L, Zhang K, Zhang N, Melo MAS, Weir MD, Zhou XD, Bai YX, Reynolds MA, Xu HHK. Developing a New Generation of Antimicrobial and Bioactive Dental Resins. *J Dent Res.* 2017; 96(8):855-863.

22. Al-Dulaijan YA, Cheng L, Weir MD, Melo MAS, Liu H, Oates TW, Wang L, Xu HHK. Novel rechargeable calcium phosphate nanocomposite with antibacterial activity to suppress biofilm acids and dental caries. *J Dent.* 2018; 72:44-52.

23. Jefferies SR. Bioactive and biomimetic restorative materials: a comprehensive review. Part I. *J Esthet Restor Dent.* 2014; 26(1):14-26.

24. Khan AS, Syed MR. A review of bioceramics-based dental restorative materials. *Dent Mater J.* 2019; 38(2):163-176.

25. Qin Z, Buehler MJ. Hierarchical nanostructures for functional materials. *Nanotechnology.* 2018; 29(28):280201.

26. Balhaddad AA, Kansara AA, Hidan D, Weir MD, Xu HHK, Melo MAS. Toward dental caries: Exploring nanoparticle-based platforms and calcium phosphate compounds for dental restorative materials. *Bioact Mater.* 2018; 4(1):43-55.

27. Zhang K, Cheng L, Weir MD, Bai YX, Xu HH. Effects of quaternary ammonium chain length on the antibacterial and remineralizing effects of a calcium phosphate nanocomposite. *Int J Oral Sci.* 2016; 8(1):45-53.

28. Cheng L, Weir MD, Xu HH, Antonucci JM, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, Zhou X. Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. *Dent Mater.* 2012; 28(5):561-72.

29. Sadat-Shojai M, Atai M, Nodehi A, Khanlar LN. Hydroxyapatite nanorods as novel fillers for improving the properties of dental adhesives: Synthesis and application. *Dent Mater* 2010; 26: 471-482.

30. Eliaz N, Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials (Basel).* 2017; 10(4):334.

31. Dorozhkin, S. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials* 2009; 2: 399–498.

32. Maas MS, Alania Y, Natale LC, Rodrigues MC, Watts DC, Braga RR. Trends in restorative composites research: what is in the future?. *Braz Oral Res.* 2017; 28:31.

33. LeGeros, R.Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem. Rev.* 2008; 108: 4742–4753.

34. Dorozhkin SV. Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics. *Materials (Basel)*. 2013; 6(9):3840-3942.
35. Skrtic D, Hailer AW, Takagi S, Antonucci JM, Eanes ED. Quantitative assessment of the efficacy of amorphous calcium phosphate/methacrylate composites in remineralizing caries-like lesions artificially produced in bovine enamel. *J Dent Res* 1996;75(9):1679–86.
36. Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED. Improved properties of amorphous calcium phosphate fillers in remineralizing resin composites. *Dent Mater* 1996;12(5):295–301.
37. Hench LL. The story of Bioglass, *J Mater Sci: Mater Med*. 2006; 17:967–978
38. Rahamana MN, Daya DE, Balb BS, Fuc Q, Junga SB, Bonewalde LF, Tomsia AP, Bioactive glass in tissue engineering *Acta Biomater*. 2011; 7(6): 2355–2373.
39. Pourbaghi-Masouleh M, Hosseini V. Amorphous calcium phosphate nanoparticles could function as a novel cancer therapeutic agent by employing a suitable targeted drug delivery platform. *Nanoscale Res Lett*. 2013; 8(1):449.
40. Son KD, Kim YJ. Anticancer activity of drug-loaded calcium phosphate nanocomposites against human osteosarcoma. *Biomater Res*. 2017; 21:13.
41. Canillas Pilar Pena M, De Aza AH, Rodríguez MA. Calcium phosphates for biomedical applications. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. 2017; 56:91–112.
42. Ding Y, Zhai K, Pei P, Lin Y, Zhu H, Shao M, Yang X, Tao W. Encapsulation of cisplatin in a pegylated calcium phosphate nanoparticle (CPNP) for enhanced cytotoxicity to cancerous cells. *J Colloid Interface Sci*. 2017;493:181–9.
43. Wang S, Wang X, Xu H, Abe H, Tan Z, Zhao Y, Guo J, Naito M, Ichikawa H, Fukumori Y. Towards sustained delivery of small molecular drugs using hydroxyapatite microspheres as the vehicle. *Adv Powder Technol*. 2010; 21:268–72.
44. Tezvergil-Mutluay A, Seseogullari-Dirihan R, Feitosa VP, Cama G, Brauer DS, Sauro S. Effects of Composites Containing Bioactive Glasses on Demineralized Dentin. *J Dent Res*. 2017; 96(9):999–1005.
45. Tay FR, Pashley DH. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. *Biomaterials*. 2008; 29(8):1127–37.
46. Tarle, Z. , M. Par. Bioactive dental composite materials. *Medical Sciences*. 2018; 45: 83-100.
47. Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED. Improved properties of amorphous calcium phosphate fillers in remineralizing resin composites. *Dent Mater*. 1996; 12: 295–301.
48. Santos C, Clarke R, Braden M, Guitian F, Davy K. Water absorption characteristics of dental composites incorporating hydroxyapatite filler. *Biomaterials*. 2002; 23:1897–1904.
49. Arcís RW, López-Macipe A, Toledano M, Osorio E, Rodríguez-Clemente R, Murtra J. Mechanical properties of visible light-cured resins reinforced with hydroxyapatite for dental restoration. *Dent. Mater*. 2002; 18:49–57.
50. Aljabo A, Abou Neel E A, Knowles JC, Young AM. Development of dental composites with reactive fillers that promote precipitation of antibacterial-hydroxyapatite layers. *Mat Sci Eng*. 2016; 60:285–292.
51. Xu HH, Weir MD, Sun L. Calcium and phosphate ion releasing composite: effect of pH on release and mechanical properties. *Dent Mater*. 2009; 25:535–542.

52. Dorozhkin SV. Medical application of calcium orthophosphate bioceramics. *Biomaterials*. 2011; 1:1-51.
53. Vallet-Regi M, González-Calbet JM. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog Sol Stat Chem*. 2004; 32:1-31.
54. Fanovich M, Castro M, Lopez JP. Structural analysis of modified hydroxyapatite powders. *Mater Res Bull*. 2001; 36:487-496.
55. Xu HH, Moreau JL, Sun L, Chow LC. Nanocomposite containing amorphous calcium phosphate nanoparticles for caries inhibition. *Dent Mater*. 2011; 27(8):762-9.
56. Jardim RN, Rocha AA, Rossi AM, de Almeida Neves A, Portela MB, Lopes RT, Pires Dos Santos TM, Xing Y, Moreira da Silva E. Fabrication and characterization of remineralizing dental composites containing hydroxyapatite nanoparticles. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020; 109:103817.
57. Natale LC, Rodrigues MC, Alania Y, Chiari MDS, Boaro LCC, Cotrim M, Vega O, Braga RR. Mechanical characterization and ion release of bioactive dental composites containing calcium phosphate particles. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018; 84:161-167.
58. Melo MA, Guedes SF, Xu HH, Rodrigues LK. Nanotechnology-based restorative materials for dental caries management. *Trends Biotechnol*. 2011; 31(8):459-67
59. Calabrese L, Fabiano F, Currò M, Borsellino C, Bonaccorsi L, Fabiano V, Ientile R, Proverbio E. Hydroxyapatite whiskers based resin composite versus commercial dental composites: mechanical and biocompatibility characterization. *Adv Mater Sci Eng*. 2016:e2172365.
60. Ayoub G, Zebic ML, Miletic V, Petrović R, Veljovic D, Janackovic D. Dissimilar sintered calcium phosphate dental inserts as dentine substitutes: Shear bond strength to restorative materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020; 108(6):2461-2470.
61. Gamulin O, Klaric E, Tarle Z. Light transmittance and polymerization kinetics of amorphous calcium phosphate composites. *Clin Oral Investig*. 2017; 21(4):1173-1182.
62. Zhang K, Zhang N, Weir MD, Reynolds MA, Bai Y, Xu HHK. Bioactive Dental Composites and Bonding Agents Having Remineralizing and Antibacterial Characteristics. *Dent Clin North Am*. 2017;61(4):669-687.
63. Pepla E, Besharat LK, Palaia G, Tenore G, Migliau G. Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Ann Stomatol (Roma)*. 2014; 5(3):108-14.
64. Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed*. 2002; 41:3130–46
65. Markovic M, Fowler BO, Tung MS. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. *J Res Natl Inst Stand Technol*. 2004; 109:553.
66. Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2002; 41(17):3130-46.
67. Ramselaar M, et al. Biodegradation of four calcium phosphate ceramics; invivo rates and tissue interactions. *JMSMM*. 1991;2:63–70.
68. Rapacz-Kmita A. FTIR and XRD investigations on the thermal stability of hydroxyapatite during hot pressing and pressureless sintering processes. *JMoSt*. 2005;744:653–6.

69. 307. Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater.* 2013; 9:8037–45.
70. Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res.* 2019; 23:4.
71. Dhivya S, Saravanan S, Sastry TP, Selvamurugan N. Nanohydroxyapatite-reinforced chitosan composite hydrogel for bone tissue repair in vitro and in vivo. *J Nanobiotechnology.* 2015; 12;13:40.
72. Thorpe AA, Creasey S, Sammon C, Le Maitre CL. Hydroxyapatite nanoparticle injectable hydrogel scaffold to support osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater.* 2016; 32:1-23.
73. Huang S, Gao S, Cheng L, Yu H. Remineralization potential of nano-hydroxyapatite on initial enamel lesions: an in vitro study. *Caries Res.* 2011; 45:460-8
74. Swarup JS, Rao A. Enamel surface remineralization: using synthetic nanohydroxyapatite. *Contemp Clin Dent.* 2012; 3:433-6.73.
75. Huang S, Gao S, Yu H. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomed Mater.* 2009; 4:1-6.
76. Kirkham J, Brookes SJ, Shore RC, Bonass WA, Smith DA, Wallwork ML, Robinson C. Atomic force microscopy studies of crystal surface topology during enamel development. *Connect Tissue Res.* 1998; 38(1-4):91-100.
77. De Carvalho FG, Vieira BR, Santos RL, Carlo HL, Lopes PQ, de Lima BA. In vitro effects of nano-hydroxyapatite paste on initial enamel carious lesions. *Pediatr Dent.* 2014; 36:85-9.
78. Venegas SC, Palacios JM, Apella MC, Morando PJ, Blesa MA. Calcium modulates interactions between bacteria and hydroxyapatite. *J Dent Res.* 2006; 85:1124-8.
79. Kim MY, Kwon HK, Choi CH, Kim BI. Combined effects of nano-hydroxyapatite and NaF on remineralization of early caries lesion. *Key Eng Mater.* 2007; 1347:330-2.
80. Yadav S, Gangwar S. Mode-I Fracture Toughness Analysis of n-HAPs Filled Dental Restorative Composites. *Silicon.* 2020: DOI.10.1007/s12633-020-00521-2
81. Yadav S, Gangwar S. The effectiveness of functionalized nano-hydroxyapatite filler on the physical and mechanical properties of novel dental restorative composite. *Int J polym biomater.* 69(14): 907-918.
82. Dorozhkin SV; Amorphous calcium (ortho)phosphates. *Acta Biomater.* 2010; 6:4457-4475.
83. Habraken W, Habibovic P, Epple M, Böhner M. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Mater. Today.* 2016; 19(2), 69-87.
84. Stämmeier JA, Purgstaller B, Hippler D, Mavromatis V, Dietzel M. In-situ Raman spectroscopy of amorphous calcium phosphate to crystalline hydroxyapatite transformation. *MethodsX.* 2018; 5:1241-1250.
85. Vecstaudza J, Gasik M, Locs J. Amorphous calcium phosphate materials: formation, structure and thermal behaviour. *J Eur Ceram Soc.* 2019; 39:1642–1649.
86. Zhao J, Liu Y, Sun W, Zhang H. Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry. *Chem Cent J.* 2011; 5:40.

87. Pan H, Liu XY, Tang R, Xu HY. Mystery of the transformation from amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite. *Chemical Communications*. 2010; 46(39):7415.
88. Yu M, Wang L, Zhang W, Ganss B. An Evolutionarily Conserved Subdomain in Amelotin Promotes Amorphous Calcium Phosphate-to-Hydroxyapatite Phase Transition. *Cryst Growth Des*. 2019; 19(4):2104-2113.
89. Epple M, Ganesan K, Heumann R, Klesing J, Kovtun A, Neumann S, Sokolova V. Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine. *J. Mater. Chem*. 2010; 20:18–23.
90. Utneja S, Talwar S, Nawal RR, Sapra S, Mittal M, Rajain A, Verma M. Evaluation of remineralization potential and mechanical properties of pit and fissure sealants fortified with nano-hydroxyapatite and nano-amorphous calcium phosphate fillers: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2018; 21(6):681-690.
91. Skrtic D, Antonucci JM. Dental composites: bioactive polymeric amorphous calcium phosphate-based. *Encycl Biomed Polym Polym Biomater*. 2015; 2015: 2443-2462.
92. Mehdawi IM, Pratten J, Spratt DA, Knowles JC, Young AM. High strength remineralizing, antibacterial dental composites with reactive calcium phosphates. *Dent Mater*. 2013; 29(4):473-84.
93. Marovic D, Tarle Z, Hiller KA, Müller R, Rosentritt M, Skrtic D, Schmalz G. Reinforcement of experimental composite materials based on amorphous calcium phosphate with inert fillers. *Dent Mater*. 2014; 30(9):1052-60.
94. Cheng L, Zhang K, Weir MD, Melo MA, Zhou X, Xu HH. Nanotechnology strategies for antibacterial and remineralizing composites and adhesives to tackle dental caries. *Nanomed*. 2015; 10:627–641.
95. Chen C, Weir MD, Cheng L, Lin NJ, Lin-Gibson S, Chow LC. Antibacterial activity and ion release of bonding agent containing amorphous calcium phosphate nanoparticles. *Dent Mater*. 2014; 30:891-901.
96. Mosa IF, Youssef M, Kamel M, Mosa OF, Helmy Y. Synergistic antioxidant capacity of CsNPs and CurNPs against cytotoxicity, genotoxicity and pro-inflammatory mediators induced by hydroxyapatite nanoparticles in male rats. *Toxicol Res (Camb)*. 2019; 8:939-952.
97. Braga RR. Calcium phosphates as ion-releasing fillers in restorative resin-based material dental materials. 2019; 35(1):3–14.
98. Zhang L, Weir MD, Chow LC, Antonucci JM, Chen J, Xu HHK. Novel rechargeable calcium phosphate dental nanocomposite. *Dent Mater*. 2016; 32:285-293.
99. Massie I, Skakle JMS, Gibson IR. Synthesis and phase stability of silicate-substituted alpha-tricalcium phosphate. *Key Eng Mater*. 2008; 361:67–70.
100. De Aza RG. α -Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater*. 2011; 7(10):3536-46.
101. Zhang H, Darvell BW. Mechanical properties of hydroxyapatite whisker-reinforced bis-GMA-based resin composites. *Dent Mater*. 2012; 28:824-830.
102. Okulus Z, Voelkel A. Mechanical properties of experimental composites with different calcium phosphates fillers. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017; 78:1101-1108.

103. Lung CYK, Sarfraz Z, Habib A, Khan AS, Matinlinna JP. Effect of silanization of hydroxyapatite fillers on physical and mechanical properties of a bis-GMA based resin composite. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016; 54:283-294.
104. Ellinger RF, Nery E, Lynch K. Histological assessment of periodontal osseous defects following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1986; 6:22.
105. Ramay HR, Zhang M. Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2004; 25:5171-80.
106. Daculsi G, Baroth S, LeGeros R. 20 years of biphasic calcium phosphate bioceramics development and applications. In: *Advances in Bioceramics and Porous Ceramics II.* 2010; p. 45-58.
107. Padovani GC, Feitosa VP, Sauro S, Tay FR, Durán G, Paula AJ, Durán N. Advances in Dental Materials through Nanotechnology: Facts, Perspectives and Toxicological Aspects. *Trends Biotechnol.* 2015; 33(11):621-636.
108. Mahmoudi M, Lynch I, Ejtehadi MR, Monopoli MP, Bombelli FB, Laurent S. Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem Rev.* 2011; 111: 5610-37.
109. Arvizo RR, Giri K, Moyano D. Identifying new therapeutic targets via modulation of protein corona formation by engineered nanoparticles. *PLoS One.* 2012; 7: e33650.
110. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113:823-839.
111. Utembe W, Potgieter K, Stefaniak AB, Gulumian M. Dissolution and biodegradability: Important parameters needed for risk assessment of nanomaterials. *Part Fibre Toxicol.* 2015; 28:12:11.
112. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules.* 2019; 25(1):112.
113. Khanna P, Ong C, Bay BH, Baeg GH. Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. *Nanomaterials (Basel).* 2015; 5(3):1163-1180.
114. Li N, Xia T, Nel AE. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(9): 1689-1699.
115. Sukhanova A, Bozrova S, Sokolov P, Berestovoy M, Karaulov A, Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Res Lett.* 2018; 13(1):44.
116. Liu N, Tang M. Toxic effects and involved molecular pathways of nanoparticles on cells and subcellular organelles. *J Appl Toxicol.* 2020; 40(1):16-36.
117. Huang YW, Wu CH, Aronstam RS. Toxicity of Transition Metal Oxide Nanoparticles: Recent Insights from in vitro Studies. *Materials (Basel).* 2010; 3(10):4842-4859.
118. Ahmed MM, Hussein MMA. Neurotoxic effects of silver nanoparticles and the protective role of rutin. *Biomed Pharmacother.* 2017; 90:731-739.

119. Ziemińska E, Stafiej A, Strużyńska L. The role of the glutamatergic NMDA receptor in nanosilver-evoked neurotoxicity in primary cultures of cerebellar granule cells. *Toxicology*. 2014; 315:38-48.
120. Yin N, Liu Q, Liu J, He B, Cui L, Li Z, Yun Z, Qu G, Liu S, Zhou Q, Jiang G. Silver nanoparticle exposure attenuates the viability of rat cerebellum granule cells through apoptosis coupled to oxidative stress. *Small*. 2013; 9(9-10):1831-41.
121. Grissa I, ElGhoul J, Mrimi R, Mir LE, Cheikh HB, Horcajada P. In deep evaluation of the neurotoxicity of orally administered TiO₂ nanoparticles. *Brain Res Bull*. 2020; 155:119-128.
122. Cui Y, Chen X, Zhou Z, Lei Y, Ma M, Cao R, Sun T, Xu J, Huo M, Cao R, Wen C, Che Y. Prenatal exposure to nanoparticulate titanium dioxide enhances depressive-like behaviors in adult rats. *Chemosphere*. 2014; 96:99-104.
123. Rahdar A, Reza Hajinezhad M, Bilal M, Askari F, Kyzas GZ. Behavioral effects of zinc oxide nanoparticles on the brain of rats. *Inorganic Chemistry Communications*. 2020; e108131. doi:10.1016/j.inoche.2020.108131
124. Ansar S, Abudawood M, Hamed SS, Aleem MM. Exposure to Zinc Oxide Nanoparticles Induces Neurotoxicity and Proinflammatory Response: Amelioration by Hesperidin. *Biol Trace Elem Res*. 2017; 175(2):360-366.
125. Niska K, Santos-Martinez MJ, Radomski MW, Inkielewicz-Stepniak I. CuO nanoparticles induce apoptosis by impairing the antioxidant defense and detoxification systems in the mouse hippocampal HT22 cell line: protective effect of crocetin. *Toxicol In Vitro*. 2015; 29(4):663-71.
126. An L, Liu S, Yang Z, Zhang T. Cognitive impairment in rats induced by nano-CuO and its possible mechanisms. *Toxicol Lett*. 2012; 213(2):220-7.
127. Goma AA, El Okle OS, Tohamy HG. Protective effect of methylene blue against copper oxide nanoparticle-induced neurobehavioral toxicity. *Behav Brain Res*. 2021; 398:112942.
128. Wang L, Mercer RR, Rojanasakul Y, Qiu A, Lu Y, Scabilloni JF, Wu N, Castranova V. Direct fibrogenic effects of dispersed single-walled carbon nanotubes on human lung fibroblasts. *J Toxicol Environ Health A*. 2010; 73(5):410-22.
129. Jin Y, Liu X, Liu H, Chen S, Gao C, Ge K, Zhang J. Oxidative stress-induced apoptosis of osteoblastic MC3T3-E1 cells by hydroxyapatite nanoparticles through lysosomal and mitochondrial pathways. *RSC Advances*. 2017; 7(21):13010–13018.
130. Xu Z, Liu C, Wei J, Sun J. Effects of four types of hydroxyapatite nanoparticles with different nanocrystal morphologies and sizes on apoptosis in rat osteoblasts. *J Appl Toxicol*. 2012; 32(6):429-35.
131. Liu H, Yazici H, Ergun C, Webster TJ, Bermek H. An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration. *Acta Biomater*. 2008; 4(5):1472-9.
132. Xu Y, Wang N, Yu Y, Li Y, Li YB, Yu YB, Zhou XQ, Sun ZW. Exposure to silica nanoparticles causes reversible damage of the spermatogenic process in mice. *PLoS One*. 2014; 9(7):e101572.
133. Mottram PL, Leong D, Crimeen-Irwin B, Gloster S, Xiang SD, Meanger J, Ghildyal R, Vardaxis N, Plebanski M. Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by

nanoparticle size: formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus. *Mol Pharm.* 2007; 4(1):73-84.

134. Wallach D, Kang TB, Kovalenko A. Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14(1):51-9.

135. Song B, Zhang Y, Liu J, Feng X, Zhou T, Shao L. Is Neurotoxicity of Metallic Nanoparticles the Cascades of Oxidative Stress? *Nanoscale Res Lett.* 2016; 11(1):291.

136. Li JJ, Muralikrishnan S, Ng CT, Yung LY, Bay BH. Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Exp Biol Med (Maywood).* 2010; 235(9):1025-33.

137. Byrne, J.D.; Baugh, J.A. The significance of nanoparticles in particle-induced pulmonary fibrosis. *McGill J. Med.* 2008; 11:43–50.

138. Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med.* 2007; 64(9):609-15.

139. Pujalté I, Passagne I, Brouillaud B, Tréguer M, Durand E, Ohayon-Courtès C, L'Azou B. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Part Fibre Toxicol.* 2011; 3(8):10.

140. Wu W, Samet JM, Peden DB, Bromberg PA. Phosphorylation of p65 is required for zinc oxide nanoparticle-induced interleukin 8 expression in human bronchial epithelial cells. *Environ Health Perspect.* 2010; 118(7):982-7.

141. Wan R, Mo Y, Feng L, Chien S, Tollerud DJ, Zhang Q. DNA damage caused by metal nanoparticles: involvement of oxidative stress and activation of ATM. *Chem Res Toxicol.* 2012; 25(7):1402-11.

142. Adeyemi OS, Shittu EO, Akpor OB, Rotimi D, Batiha GE. Silver nanoparticles restrict microbial growth by promoting oxidative stress and DNA damage. *EXCLI J.* 2020;19:492-500.

143. Han B, Pei Z, Shi L, Wang Q, Li C, Zhang B, Su X, Zhang N, Zhou L, Zhao B, Niu Y, Zhang R. TiO₂ Nanoparticles Caused DNA Damage in Lung and Extra-Pulmonary Organs Through ROS-Activated FOXO3a Signaling Pathway After Intratracheal Administration in Rats. *Int J Nanomedicine.* 2020; 15:6279-6294.

144. Rinna A, Magdolenova Z, Hudecova A, Kruszewski M, Refsnes M, Dusinska M. Effect of silver nanoparticles on mitogen-activated protein kinases activation: role of reactive oxygen species and implication in DNA damage. *Mutagenesis.* 2015; 30(1):59-66.

145. Wan R, Mo Y, Zhang Z, Jiang M, Tang S, Zhang Q. Cobalt nanoparticles induce lung injury, DNA damage and mutations in mice. *Part Fibre Toxicol.* 2017; 14(1):38.

146. Angelé-Martínez C, Nguyen KV, Ameer FS, Anker JN, Brumaghim JL. Reactive oxygen species generation by copper(II) oxide nanoparticles determined by DNA damage assays and EPR spectroscopy. *Nanotoxicology.* 2017; 11(2):278-288.

147. Zijno A, De Angelis I, De Berardis B, Andreoli C, Russo MT, Pietraforte D, Scorza G, Degan P, Ponti J, Rossi F, Barone F. Different mechanisms are involved in oxidative DNA damage and genotoxicity induction by ZnO and TiO₂ nanoparticles in human colon carcinoma cells. *Toxicol In Vitro.* 2015; 29(7):1503-12.

148. Nemmar A, Yuvaraju P, Beegam S, Fahim MA, Ali BH. Cerium Oxide Nanoparticles in Lung Acutely Induce Oxidative Stress, Inflammation, and DNA Damage in Various Organs of Mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017:9639035.

149. Asharani PV, Xinyi N, Hande MP, Valiyaveetil S. DNA damage and p53-mediated growth arrest in human cells treated with platinum nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*. 2010; 5(1):51-64.
150. Ng KW, Khoo SP, Heng BC, Setyawati MI, Tan EC, Zhao X, Xiong S, Fang W, Leong DT, Loo JS. The role of the tumor suppressor p53 pathway in the cellular DNA damage response to zinc oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2011; 32(32):8218-25.
151. Shukla RK, Kumar A, Gurbani D, Pandey AK, Singh S, Dhawan A. TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells. *Nanotoxicology*. 2013; 7(1):48-60.
152. Kim HR, Shin DY, Park YJ, Park CW, Oh SM, Chung KH. Silver nanoparticles induce p53-mediated apoptosis in human bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *J Toxicol Sci*. 2014; 39(3):401-12.
153. Wang L, Zhou G, Liu H, Niu X, Han J, Zheng L, Fan Y. Nano-hydroxyapatite particles induce apoptosis on MC3T3-E1 cells and tissue cells in SD rats. *Nanoscale*. 2012; 4(9):2894-9.
154. Liu LP, Xiao YB, Xiao ZW, Wang ZB, Li C, Gong X. Toxicity of hydroxyapatite nanoparticles on rabbits. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2005; 34(4):474-6.
155. Ooi JP, Kasim SR, Shaari RB, Saidin NA. In vivo efficacy and toxicity of synthesized nano- β -tricalcium phosphate in a rabbit tibial defect model. *Toxicol. Res. Appl*. 2018; 2: 1–9.
156. Masouleh MP, Hosseini V, Pourhaghgouy M, Bakht MK. Calcium Phosphate Nanoparticles Cytocompatibility Versus Cytotoxicity: A Serendipitous Paradox. *Curr Pharm Des*. 2017; 23(20):2930-2951.
157. Lynch I, Dawson KA, Linse S. Detecting cryptic epitopes created by nanoparticles. *Sci STKE* 2006; 2006:14.
158. Walczyk D, Bombelli FB, Monopoli MP, Lynch I, Dawson KA. What the cell "sees" in bionanoscience. *J Am Chem Soc* 2010; 132:5761-8.
159. Li G, Huang J, Li Y, et al. In vitro study on influence of a discrete nano-hydroxyapatite on leukemia P388 cell behavior. *Biomed Mater Eng* 2007; 17:321-7.
160. Liu X, Zhao M, Lu J, Ma J, Wei J, Wei S. Cell responses to two kinds of nanohydroxyapatite with different sizes and crystallinities. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7:1239-50
161. Hwang IS, Lee J, Hwang JH, Kim KJ, Lee DG. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS J*. 2012; 279(7):1327-38.
162. Guo D, Bi H, Liu B, Wu Q, Wang D, Cui Y. Reactive oxygen species-induced cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in rat retinal ganglion cells. *Toxicol In Vitro*. 2013; 27(2):731-8.
163. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 460(1):72-81.
164. Miedlich SU, Zalutskaya A, Zhu ED, Demay MB. Phosphate induced apoptosis of hypertrophic chondrocytes is associated with a decrease in mitochondrial membrane potential and is dependent upon Erk1/2 phosphorylation. *J Biol Chem* 2010; 285:18270-5.

165. Liu L, Dai H, Wu Y, Li B, Yi J, Xu C, Wu X. In vitro and in vivo mechanism of hepatocellular carcinoma inhibition by β -TCP nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2019; 14:3491-3502.
166. Meena R, Kesari K, Rani M, Paulraj R. Effects of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of human breast cancer cells (MCF-7). *J Nanoparticle Res* 2012; 14: 1-11.
167. El-Masry TA, Altwaijry N, Alotaibi B, Tousson E, Alboghdadly A, Saleh A. Chicory (*Cichorium intybus* L.) extract ameliorates hydroxyapatite nanoparticles induced kidney damage in rats. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2020. DOI:10.36721/PJPS.2020.33.3.SUP.1251-1260.1
168. Sun J, Ding T. p53 reaction to apoptosis induced by hydroxyapatite nanoparticles in rat macrophages. *J Biomed Mater Res A*. 2009;88(3):673-9.
169. Hong Y, Fan H, Li B, Guo B, Liu M, Zhang X. Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphate nanoceramics. *Mater Sci Eng R:Reports*. 2010; 70(3-6):225–42.
170. Abbas OA, Ibrahim IG, Ismail AE. Therapeutic Effects of Nano-HAp in a Rat Model of AlCl₃ Induced Neurotoxicity. *Iran J Pharm Res*. 2019; 18:1309-22.
171. Xu J, Xu P, Li Z, Huang J, Yang Z. Oxidative stress and apoptosis induced by hydroxyapatite nanoparticles in C6 cells. *J Biomed Mater Res A*. 2012; 100(3):738-45.
172. Wu T., Tang M., The inflammatory response to silver and titanium dioxide nanoparticles in the central nervous system. *Nanomedicine (Lond)*. 2018; 13(2):233-249.
173. Sun C., Yin N., Wen R., Liu W., Jia Y., Hu L., Zhou Q., Jiang G., Silver nanoparticles induced neurotoxicity through oxidative stress in rat cerebral astrocytes is distinct from the effects of silver ions, *Neurotoxicology*. 2016; 52:210-21.
174. Skalska J, Dąbrowska-Bouta B, Strużyńska L, Oxidative stress in rat brain but not in liver following oral administration of a low dose of nanoparticulate silver, *Food Chem. Toxicol*. 2016; 97:307-315.
175. Sruthi S, Millot N, Mohanan PV, Zinc oxide nanoparticles mediated cytotoxicity, mitochondrial membrane potential and level of antioxidants in presence of melatonin, *Int. J. Biol. Macromol*. 2017; 103:808-818.
176. Attia H, Nounou H, Shalaby M. Zinc oxide nanoparticles induced oxidative DNA damage, inflammation and apoptosis in rat's brain after oral exposure. *Toxics*. 2018; 6(2): e29.
177. Siddiqi NJ, Abdelhalim MA, El-Ansary AK, Alhomida AS, Ong WY, Identification of potential biomarkers of gold nanoparticle toxicity in rat brains. *J. Neuroinflammation*, 2012; 9:123.
178. Mirshafa A, Nazari M, Jahani D, Shaki F. Size-dependent neurotoxicity of aluminum oxide particles: a comparison between nano- and micrometer size on the basis of mitochondrial oxidative damage, *Biol Trace Elem Res*. 2018; 183(2):261-269.
179. Shrivastava R, Raza S, Yadav A, Kushwaha P, Flora SJ. Effects of sub-acute exposure to TiO₂, ZnO and Al₂O₃ nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug Chem. Toxicol*. 2014; 37(3):336-47.
180. Sawicki K, Czajka M, Matysiak-Kucharek M, Fal B, Drop B, Męczyńska-Wielgosz S, Sikorska K, Kruszewski M, Kapka-Skrzypczak L. Toxicity of metallic nanoparticles in the central nervous system. *Nanotechnol Rev* 2019; 8:175–200

181. Cui Y, Che Y, Wang H. Nono-titanium dioxide exposure during the adolescent period induces neurotoxicities in rats: Ameliorative potential of bergamot essential oil. *Brain Behav.* 2021:e02099.
182. Hassanen EI, Ibrahim MA, Hassan AM, Mehanna S, Aljuaydi SH, Issa MY. Neuropathological and Cognitive Effects Induced by CuO-NPs in Rats and Trials for Prevention Using Pomegranate Juice. *Neurochem Res.* 2021; 46(5):1264-1279.
183. M'rad I, Jeljeli M, Rihane N, Hilber P, Sakly M, Amara S. Aluminium oxide nanoparticles compromise spatial learning and memory performance in rats. *EXCLI J.* 2018; 17:200-210.
184. Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 595:105-25
185. Shapoval GS, Gromovaia VF. Mechanism of antioxidant protection of an organism from oxidative stress. *Ukr Biokhim Zh.* 2003; 75(2):5-13.
186. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:761264.
187. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J.* 2016 Jul 25;15(1):71..
188. Di Meo S, Venditti P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2020; 2020:9829176.818.
189. Hamid AA, Aiyelaagbe OO, Usman LA, Ameen OM, Lawal A. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry.* 2010; 4(8):142-151.
190. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* 2018; 13:757-772.
191. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1999; 82(2):291-5.
192. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, Gupta PK, Pakuwal U. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(11):4405-9.
193. Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci.* 2011; 32(3):125-30.
194. Jakubczyk K, Kałduńska J, Dec K, Kawczuga D, Janda K. Antioxidant properties of small-molecule non-enzymatic compounds. *Pol Merkur Lekarski.* 2020; 48(284):128-132
195. Haida Z, Hakiman M. A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Sci Nutr.* 2019; 7(5):1555-1563.
196. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014;224:164-75.
197. Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 2013; 51:15-25.
198. Rasheed A, Abdul Azeez RF. A Review on Natural Antioxidants. 2019; DOI:10.5772/intechopen.82636

199. Pohl F, Kong Thoo Lin P. The potential use of plant natural products and plant extracts with antioxidant properties for the prevention/treatment of neurodegenerative diseases: in vitro, in vivo and clinical trials. *Molecules*. 2018; 23(12):3283.
200. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018; 13:757-772.
201. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015; 97:55-74.
202. Ramana KV, Reddy ABM, Majeti NVRK, Singhal SS. Therapeutic Potential of Natural Antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018:9471051
203. Katanić J, Matić S, Pferschy-Wenzig EM, Kretschmer N, Boroja T, Mihailović V, Stanković V, Stanković N, Mladenović M, Stanić S, Mihailović M, Bauer R. Filipendula ulmaria extracts attenuate cisplatin-induced liver and kidney oxidative stress in rats: In vivo investigation and LC-MS analysis. *Food Chem Toxicol*. 2017; 99:86-102.
204. Barros L, Cabrita L, Boas MV, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants, *Food Chemistry*. 2011; 127(4):1600-1608.
205. Šarić-Kundalić B, Dobeš C, Klatt-Asselmeyer V, Saukel J. Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *J. Ethnopharmacol*. 2011; 133:1051–1076.
206. Boeing T, da Silva LM, Somensi LB, Cury BJ, Michels Costa AP, Petreanu M, Niero R, de Andrade SF. Antiulcer mechanisms of *Vernonia condensata* Baker: A medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer. *J Ethnopharmacol*. 2016; 184:196-207
207. DiPasquale R. Effective Use of Herbal Medicine in Urinary Tract Infections. *J Diet Suppl*. 2008; 5(3):219-228.
208. Lupatini NR, Danopoulos P, Swikidisa R, Alves PV. Evaluation of the Antibacterial Activity of Green Propolis Extract and Meadowsweet Extract Against *Staphylococcus aureus* Bacteria: Importance in Would Care Compounding Preparations. *Int J Pharm Compd*. 2016; 20(4):333-337.
209. Katanić J, Boroja T, Stanković N, Mihailović V, Mladenović M, Kreft S, Vrvic MM. Bioactivity, stability and phenolic characterization of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. *Food Funct*. 2015; 6(4):1164-75.
210. Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 1990; 9(1):19-21.
211. de Whalley CV, Rankin SM, Houlst JR, Jessup W, Leake DS. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol*. 1990; 39(11):1743-50.
212. Loughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Houlst JR, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol*. 1991; 42(9):1673-81.
213. Grinberg LN, Rachmilewitz EA, Newmark H. Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation. *Biochem Pharmacol*. 1994; 48(4):643-9.

214. Samardžić S, Arsenijević J, Božić D, Milenković M, Tešević V, Maksimović Z. Antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench. *J Ethnopharmacol.* 2018; 213:132-137.
215. Shilova I, Krasnov E, Korotkova E, Nagaev M, Lukin A. Antioxidant properties of extracts from the above-ground parts of *Filipendula ulmaria*. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2006; 40: 660-662.
216. Pukalskienė M, Venskutonis R, Pukalskas A. Phytochemical characterization of *Filipendula ulmaria* by UPLC/Q-TOF-MS and evaluation of antioxidant activity. *Rec Nat Prod.* 2015; 9:451-455.
217. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 2011; 82(4):513–523.
218. Tunón H, Olavsdotter C, Bohlin L. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. *J Ethnopharmacol.* 1995; 48(2):61-76.
219. Katanić J, Boroja T, Mihailović V, Nikles S, Pan SP, Rosić G, Selaković D, Joksimović J, Mitrović S, Bauer R. In vitro and in vivo assessment of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) as anti-inflammatory agent. *J Ethnopharmacol.* 2016;193:627-636.
220. Samardžić S, Tomić M, Pecikoza U, Stepanović-Petrović R, Maksimović Z. Antihyperalgesic activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench in a rat model of inflammation. *J Ethnopharmacol.* 2016;193:652-656.
221. Halkes SBA, Beukelman CJ, Kroes BH, van den Berg AJJ, Labadie RP, van Dijk H. In vitro immunomodulatory activity of *Filipendula ulmaria*. *Phytother Res.* 1997; 11(7): 518-520.
222. Drummond EM, Harbourne N, Marete E, Martyn D, Jacquier J, O'Riordan D, Gibney ER. Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP1 macrophages by polyphenols derived from chamomile, meadowsweet and willow bark. *Phytother Res.* 2013; 27(4):588-94.
223. Vogl S, Picker P, Mihaly-Bison J, Fakhruddin N, Atanasov AG, Heiss EH, Wawrosch C, Reznicek G, Dirsch VM, Saukel J, Kopp B. Ethnopharmacological in vitro studies on Austria's folk medicine an unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. *J Ethnopharmacol.* 2013; 149(3):750-71.
224. Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol.* 2000; 56(1):3-12.
225. Cwikla C, Schmidt K, Matthias A, Bone KM, Lehmann R, Tiralongo E. Investigations into the antibacterial activities of phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Phytother Res.* 2010; 24(5):649-56.
226. Bespalov VG, Alexandrov VA, Semenov AL, Vysochina GI, Kostikova VA, Baranenko DA. The inhibitory effect of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. on colorectal carcinogenesis induced in rats by methylnitrosourea. *J Ethnopharmacol.* 2018; 227:1-7.
227. Spiridonov NA, Konovalov DA, Arkhipov VV. Cytotoxicity of some Russian ethnomedicinal plants and plant compounds. *Phytother Res.* 2005; 19(5):428-32.
228. Matić S, Katanić J, Stanić S, Mladenović M, Stanković N, Mihailović V, Boroja T. In vitro and in vivo assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* methanol extracts. *J Ethnopharmacol.* 2015; 174:287-92.

229. Selakovic, D. (2018). Bihevioralni efekti hronične primene suprafizioloških doza androgenih anaboličkih steroida i programiranog trenažnog procesa kod pacova. Doktorska disertacija. Kragujevac: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu.
230. Joksimovic, J. (2018). Uticaj androgenih anaboličkih steroida na bihevioralne manifestacije uzrokovane restrikcijom unosa hrane kod pacova. Doktorska disertacija. Kragujevac: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu.
231. Mijailovic, N. (2019). Bihevioralni efekti dugotrajne primene dijetetskih protokola sa povećanim sadržajem metionina i nedostatkom folata, piridoksina i kobalamina kod pacova. Doktorska disertacija. Kragujevac: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu.
232. Stajic, D. (2019). Uticaj galektina-3 u modulaciji ponašanja. Doktorska disertacija. Kragujevac: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu.
233. Kubmburovic, I. (2020). Efekti primene ekstrakta biljke *Satureja hortensis* L. na bihevioralne manifestacije neurotoksiciteta izazvane cisplatinom kod pacova. Doktorska disertacija. Kragujevac: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu.
234. Rosic G, Joksimovic J, Selakovic D, Milovanovic D, Jakovljevic V. Anxiogenic effects of chronic exposure to nandrolone decanoate (ND) at supraphysiological dose in rats: a brief report. *Neuro Endocrinol Lett.* 2014; 35(8):703-10.
235. Arsenijevic N, Selakovic D, Katanic Stankovic JS, Mihailovic V, Mitrovic S, Milenkovic J, Milanovic P, Vasovic M, Markovic SD, Zivanovic M, Grujic J, Jovicic N, Rosic G. The beneficial role of *Filipendula ulmaria* extract in prevention of prodepressant effect and cognitive impairment induced by nanoparticles of calcium phosphates in rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2021; 2021:6670135.
236. Arsenijevic N, Milenkovic J, Milanovic P, Arnaut A, Jovanovic M, Velickovic S, Scepanovic R, Selakovic D. Does an alteration in nociceptive response to mineral components of dental composites involve changes in oxidative status? A brief report. *Serbian J. Exp. Clin. Res.*,2020. DOI: 10.2478/sjocr-2020-0050.
237. Jangra A, Kwatra M, Singh T, Pant R, Kushwah P, Ahmed S, Dwivedi D, Saroha B, Lahkar M. Edaravone alleviates cisplatin-induced neurobehavioral deficits via modulation of oxidative stress and inflammatory mediators in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 2016; 791:51-61.
238. Younes NR, Amara S, Mrad I, Ben-Slama I, Jeljeli M, Omri K, El Ghouli J, El Mir L, Rhouma KB, Abdelmelek H, Sakly M. Subacute toxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in male rats: emotional behavior and pathophysiological examination. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015; 22(11):8728-37.
239. Zhang S, Jiang X, Cheng S, Fan J, Qin X, Wang T, Zhang Y, Zhang J, Qiu Y, Qiu J, Zou Z, Chen C. Titanium dioxide nanoparticles via oral exposure leads to adverse disturbance of gut microecology and locomotor activity in adult mice. *Arch Toxicol.* 2020; 94(4):1173-1190.
240. Javurek AB, Suresh D, Spollen WG, Hart ML, Hansen SA, Ellersieck MR, Bivens NJ, Givan SA, Upendran A, Kannan R, Rosenfeld CS. gut dysbiosis and neurobehavioral alterations in rats exposed to silver nanoparticles. *Sci Rep.* 2017; 7(1):2822.
241. Tarlan M, Sajedianfard J, Fathi M. Effect of titanium dioxide nanoparticles administered during pregnancy on depression-like behavior in forced swimming and tail suspension tests in offspring mice. *Toxicol Ind Health.* 2020; 36(4):297-304.

242. Alimohammadi S, Hosseini MS, Behbood L. Prenatal exposure to zinc oxide nanoparticles can induce depressive-like behaviors in mice offspring. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2018. doi.org/10.1007/s10989-018-9686-9
243. Tabatabaei SR, Moshrefi M, Askaripour M. Prenatal exposure to silver nanoparticles causes depression like responses in mice. *Indian J Pharm Sci.* 2015; 77(6):681-6.
244. Hong F, Zhou Y, Ji J, Zhuang J, Sheng L, Wang L. Nano-TiO₂ inhibits development of the central nervous system and its mechanism in offspring mice. *J Agric Food Chem.* 2018; 66(44):11767-11774.
245. Greish K, Alqahtani AA, Alotaibi AF, Abdulla AM, Bukelly AT, Alsobyani FM, Alharbi GH, Alkiyumi IS, Aldawish MM, Alshahrani TF, Pittalà V, Taurin S, Kamal A. The Effect of silver nanoparticles on learning, memory and social interaction in BALB/C mice. *Int J Environ Res Public Health.* 2019; 16(1):148.
246. Kesmati M, Torabi M, Ghandizadeh-Dezfuli M. Nanoparticles of zinc oxide reduces acute somatic pain in adult female wistar rats. *Zahedan J Res Med Sci.* 2014; 16(2):24-28.
247. Teisseyre A, Mercik K, Mozrzymas JW. The modulatory effect of zinc ions on voltage-gated potassium currents in cultured rat hippocampal neurons is not related to Kv1.3 channels. *J Physiol Pharmacol.* 2007; 58(4):699-715.
248. Kesmati M, Torabi M. Interaction between Analgesic Effect of nano and conventional size of zinc oxide and opioidergic system activity in animal model of acute pain. *Basic Clin Neurosci.* 2014; 5(1):80-7.
249. Torabi M, Kesmati M, Galehdari H, Varzi HN, Pourreza N. MgO and ZnO nanoparticles anti-nociceptive effect modulated by glutamate level and NMDA receptor expression in the hippocampus of stressed and non-stressed rats. *Physiol Behav.* 2020; 214:112727.
250. Mahmoudvand H, Khaksarian M, Ebrahimi K, Shiravand S, Jahanbakhsh S, Niazi M, Nadri S. Antinociceptive effects of green synthesized copper nanoparticles alone or in combination with morphine. *Ann Med Surg (Lond).* 2020; 51:31-36.
251. 431. A. Rahdar, M. R. Hajinezhad, M. Bilal, F. Askari, and G. Z. Kyzas, "Behavioral effects of zinc oxide nanoparticles on the brain of rats," *Inorganic Chemistry Communications*, vol. 119, p. 108131, 2020.
252. Ouni S, Askri D, Jeljeli M, Abdelmalek H, Sakly M, Amara S. Toxicity and effects of copper oxide nanoparticles on cognitive performances in rats. *Arch Environ Occup Health.* 2020;75(7):384-394.
253. Liu F, Mahmood M, Xu Y, Watanabe F, Biris AS, Hansen DK, Inselman A, Casciano D, Patterson TA, Paule MG, Slikker W Jr, Wang C. Effects of silver nanoparticles on human and rat embryonic neural stem cells. *Front Neurosci.* 2015;9:115.
254. Kandeil MA, Mohammed ET, Hashem KS, Aleya L, Abdel-Daim MM. Moringa seed extract alleviates titanium oxide nanoparticles (TiO₂-NPs)-induced cerebral oxidative damage, and increases cerebral mitochondrial viability. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020; 27(16):19169-19184.
255. Redza-Dutordoir M and Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1863:2977-2992.

256. Miedlich SU, Zalutskaya A, Zhu ED and Demay MB. Phosphate-induced apoptosis of hypertrophic chondrocytes is associated with a decrease in mitochondrial membrane potential and is dependent upon Erk1/2 phosphorylation. *J Biol Chem*. 2010; 285:18270-5.
257. Shi Z, Huang X, Cai Y, Tang R, Yang D. Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells. *Acta Biomater*. 2009; 5(1):338-45.
258. Tezcan B, Hacıoğlu G, Abidin S and Abidin I. Apoptotic Effects of Reduced Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) on Mouse Liver and Kidney. *Dicle Med J*. 2017; 44:315-324.
259. Xu D, Lian D, Wu J, Liu Y, Zhu M, Sun J, et al. Brain-derived neurotrophic factor reduces inflammation and hippocampal apoptosis in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Neuroinflammation*. 2017; 14:156.
260. Ryu JR, Hong CJ, Kim JY, Kim EK, Sun W and Yu SW. Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain. *Mol Brain*. 2016; 9:43.
261. Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C and Croll S. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol*. 2005; 192:348-56.
262. Pillai Pillai A. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in the pathogenesis and novel pharmacotherapy of schizophrenia. *Neurosignals*. 2008;16:183-93.
263. JH Park, S Gurunathan, YJ Choi, JW Han, H Song, JH Kim. Silver nanoparticles suppresses brain-derived neurotrophic factor-induced cell survival in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Ind Eng Chem*. 2017; 47:62–73.
264. Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G and Soares JC. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry*. 2003; 8:721-37.
265. Vukovic R, Kumburovic I, Joksimovic Jovic J, Jovicic N, Katanic Stankovic JS, Mihailovic V, et al. N-Acetylcysteine Protects against the Anxiogenic Response to Cisplatin in Rats. *Biomolecules*. 2019; 9:892.
266. Selakovic D, Joksimovic J, Zaletel I, Puskas N, Matovic M, Rosic G. The opposite effects of nandrolone decanoate and exercise on anxiety levels in rats may involve alterations in hippocampal parvalbumin-positive interneurons. *PLoS One*. 2017; 12:e0189595.
267. Stajic D, Selakovic D, Jovicic N, Joksimovic J, Arsenijevic N, Lukic ML, et al. The role of galectin-3 in modulation of anxiety state level in mice. *Brain Behav Immun*. 2019; 78:177-187.

СКРАЋЕНИЦЕ

HA - хидроксиапатит

АСР – аморфни калцијум фосфат

МСРМ - монокалцијум фосфат монохидрат

ДСРД - дикалцијум фосфат дихидрат

ТСР - трикалцијум фосфат

ТТСР - тетракалцијум фосфат

ОСР – октакалцијум фосфат

ДНК – деоксирибонуклеинска киселина

ROS – реактивне врсте кисеоника (енгл. *reactive oxygen species*)

NF-κB - нуклеарни фактор κB (енгл. *nuclear factor κB*)

МАРК – митогеном-активирана протеинска киназа (енгл. *mitogen-activated protein kinase*)

PI3Ks – фосфоинозитид 3 киназа (енгл. *phosphoinositide 3-kinases*)

TNFα – фактор некрозе тумора α (енгл. *tumor necrosis factor-α*)

IL - интерлеукин (енгл. *interleukin*)

AST – аспартат трансминаза

ALT – аланин трансминаза

ALP – алкална фосфатаза

Bax - Bcl2 удружени X протеин (енгл. *Bcl2-associated X protein*)

Bcl-2 - Лимфом В ћелија 2 (енгл. *B-cell lymphoma 2*)

ММР - митохондријски мембрански потенцијал (енгл. *mitochondrial membrane potential*)

АТФ - аденозин трифосфат

САТ - каталаза

SOD - супероксид дисмутаза

GR - глутатион редуктаза

GSH-Px - глутатион пероксидаза

GSH – глутатион

FU – медуника (лат. *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim)

COX-1 – циклооксигеназа 1

COX-2 – циклооксигеназа 2

BDNF – неуротрофни фактор раста пореклом из мозга (енгл. *brain derived neurotrophic factor*)

OF тест- тест отвореног поља (енгл. *open field test*)

ЕРМ тест - тест уздигнутог крстастог лавиринта (енгл. *elevated plus maze test*)

TS тест– тест качења за реп (енгл. *tail suspension test*)

NOR тест – тест препознавања новог објекта (енгл. *novel object recognition test*)

ТВАРS – тиобарбитурна киселина

УВЦЗ - укупно време проведено у централној зони

БУЦЗ – број улазака у централну зону

УПП – укупни пређени пут

БУ – број усправљања уз зид

БСУ – број слободних усправљања

УБУ- укупан број усправљања

УВОК – укупно време проведено у отвореним крацима

БУОК – број улазака у отворене краке

%ВК – проценат времена кретања

БЗН – број заштићених нагињања

БНН - број незаштићених нагињања
ТЕА – број епизода експлоративне активности
ВППИ - време до појаве прве имобилности
БЕИ – број епизода имобилности
УВИ – укупно време имобилности
ПВИ – просечно време имобилности
БУЗНО – број улазака у зону новог објекта
УВЗНО – укупно време проведено у зони новог објекта
ГЗНО – време у коме је глава животиње била окренута ка новом објекту
РВ – реакционо време
ВДР – време до реакције
иРНК – информациона рибонуклеинска киселина
СА - амонов рог (лат. *cornu ammonis*)
DG - дентатни гирус (лат. *gyrus dentatus*)
GABA-AR2S – GABA-A α -2 рецепторска субјединица (енгл. *GABA receptor subunit alpha-2*)
Rac1 – енгл. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*
Cdc42 - енгл. *Cell division control protein 42 homolog*
Rho A - енгл. *Ras homolog family member A*
НО-1 – хем оксигеназа-1
Nrf2 – енгл. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
NMDA – N-метил-D-аспартат (енгл. *N-methyl-D-aspartate*)
MDA – малондиалдехид

БИОГРАФИЈА

Наталија Арсенијевић је рођена 2.11.1984. године у Крагујевцу, где је завршила Основну школу „Јован Поповић“ и Прву крагујевачку гимназију. Стоматолошки факултет Универзитета у Београду уписује школске 2003/2004. године, а дипломира 5.7.2011. године са просечном оценом 8,62.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином, уписала је 2011/2012. године. Усмени докторски испит положила је јула 2013. године са оценом 9.

Специјалистичке студије из области стоматологије Болести зуба и ендодонција уписала је 20.1.2015. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и друга је година.

Од 2012. до 2016. године била је запослена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу као сарадник у настави, а потом и као истраживач сарадник за ужу научну област Болести зуба и ендодонција. Од 2020. године ангажована је као истраживач приправник за ужу научну област Болести зуба и ендодонција. Као клинички лекар била је запослена у Заводу за стоматологију Крагујевац од 2012. до 2018. године.

Аутор је више оригиналних научних радова, међу којима су и два рада чији су резултати уврштени у садржај докторске дисертације.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Arsenijevic N**, Selakovic D, Katanic Stankovic JS, Mihailovic V, Mitrovic S, Milenkovic J, Milanovic P, Vasovic M, Markovic SD, Zivanovic M, Grujic J, Jovicic N, Rosic G. The Beneficial Role of Filipendula ulmaria Extract in Prevention of Prodepressant Effect and Cognitive Impairment Induced by Nanoparticles of Calcium Phosphates in Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;10;2021:6670135.
2. **Arsenijevic N**, Milenkovic J, Milanovic P, Arnaut A, Jovanovic M, Velickovic S, Scepanovic R, Selakovic D. Does an alteration in nociceptive response to mineral components of dental composites involve changes in oxidative status? A brief report. *Serbian J. Exp. Clin. Res.*, 2020, DOI: 10.2478/sjecr-2020-0050.
3. Arsenijevic M, Milovanovic M, Jovanovic S, **Arsenijevic N**, Markovic BS, Gazdic M, Volarevic V. In vitro and in vivo anti-tumor effects of selected platinum(IV) and dinuclear platinum(II) complexes against lung cancer cells. *J Biol Inorg Chem.* 2017;22(6):807-817.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Наталија Арсенијевић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

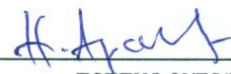
Ефекти примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на бихевиоралне манифестације неуротоксичности изазване наночестицама калцијум фосфата код пацова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 13.5.2021. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Наталија Арсенијевић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Ефекти примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. на бихевиоралне манифестације неуротоксичности изазване наночестицама калцијум фосфата код пацова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 13. 5. 2021 године,



 потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org/rs/>